



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**ESTUDO DA INFECÇÃO NATURAL POR PROTOZOÁRIOS DOS GÉNEROS
Babesia E *Theileria* NUMA EXPLORAÇÃO COUDÉLICA DO RIBATEJO**

BRUNO MIGUEL DA CUNHA DUARTE REGO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

ORIENTADOR

Dr. António Carlos Pinto Farrim

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel dos Anjos Ferreira

2008
LISBOA

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar por agradecer aos meus pais e irmã, por serem eles a minha grande referência, e por todo o apoio e incentivo que me deram ao longo deste meu percurso académico e em todos os momentos, bons e maus, da minha vida.

Ao meu orientador científico, o Dr. António Carlos Pinto Farrim, um agradecimento especial, pelas oportunidades diárias de observar e realizar pessoalmente procedimentos na clínica de equinos e bovinos, bem como pela possibilidade de observar a sua forma competente de trabalhar. Para além dos conhecimentos que me transmitiu, agradeço-lhe a amizade demonstrada, o que enriqueceu em tudo este meu período de estágio.

Ao meu co-orientador, o Professor Doutor Luís Manuel dos Anjos Ferreira, pela disponibilidade demonstrada desde o início do estágio.

Ao Professor Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho, pela orientação, apoio científico e disponibilidade que sempre manifestou nas diferentes etapas da realização deste trabalho.

Um agradecimento à Administração da Companhia das Lezírias, S.A., por se dignar autorizar o meu estágio e todos os trabalhos a ele inerentes, o qual possibilitou o estudo de um animal de grande apreço Veterinário, o Cavalo Lusitano.

Agradeço ainda a todos os funcionários da Companhia das Lezírias, pela forma como me receberam nesta casa, pela boa disposição e disponibilidade para ajudar em tudo o que fosse necessário. Pela camaradagem e ajuda na realização deste ensaio, um muito obrigado ao José Miguel, Orlando, Daniel e Ana Maria.

Obrigado igualmente aos meus amigos, que estiveram sempre presentes quando precisei deles, e sem os quais todo o este percurso teria sido impossível ou teria sido, seguramente, bastante diferente.

RESUMO

Estudo da infecção natural por protozários dos géneros *Babesia* e *Theileria* numa exploração coudélica do Ribatejo.

A piroplasmose equina, considerada a única doença intra-eritrocitária dos equinos, produzida pelos parasitas protozoários intra-eritrocitários, *Babesia caballi* e *Theileria equi* e transmitida principalmente por vectores da família Ixodidae, afigura-se como uma afecção de elevada patogenicidade e de grande importância económica. No que se refere às restrições impostas ao movimento de equinos, estas reflectem-se sobretudo em países tradicionalmente produtores e exportadores de cavalos, como é o caso de Portugal, onde a situação é endémica.

Neste trabalho, para além do acompanhamento clínico-sanitário da babesiose e theileriose equinas nos animais propriedade da Coudelaria da “Companhia das Lezírias, S.A.”, foram analisados esfregaços sanguíneos de 10 éguas e respectivos poldros, com idade inferior a dez dias na altura da colheita das amostras. Desta forma procurámos avaliar a possibilidade de transmissão dos agentes da piroplasmose equina pela via transplacentária. Foi também realizado um levantamento da situação epidemiológica da doença no efectivo equino desta coudelaria, localizada no Ribatejo, recorrendo à análise de esfregaços sanguíneos de 47 animais, divididos por diferentes grupos consoante a sua idade, sexo e sistema de produção em que se encontravam.

No que diz respeito ao ensaio sobre a possibilidade de transmissão transplacentária dos agentes da piroplasmose, concluímos que os quatro poldros que obtiveram resultados positivos para *T. equi* (40%) eram descendentes de éguas também elas positivas para o mesmo parasita, e que 80% dos poldros nascidos das cinco éguas positivas apresentaram também esfregaços positivos para *T. equi*. Estes resultados permitiram-nos comprovar a existência de uma possível ocorrência de transmissão transplacentária de *T. equi*, contudo não foi possível comprovar a mesma situação para *B. caballi*.

Relativamente ao estudo da prevalência da doença no efectivo equino da coudelaria, 6,38% deles apresentaram esfregaços positivos para o agente *B. caballi*, enquanto que os equinos com resultados positivos para *T. equi* perfizeram 42,55%, num total de 48,94% de amostras positivas analisadas. Nos animais analisados neste estudo, 51,06% foram considerados negativos para ambos os parasitas. Mesmo admitindo que a nossa amostragem possa não reflectir exactamente a realidade epidemiológica na Coudelaria da CL, os resultados obtidos permitem-nos concluir que estamos perante uma região com elevados níveis de prevalência destes agentes, sobretudo *T. equi*, na população equina.

Palavras-chave: *Babesia caballi*, *Theileria equi*, esfregaço sanguíneo, transmissão transplacentária, prevalência, Cavalo Lusitano.

ABSTRACT

Study of the natural infection by protozoa of the genus *Babesia* and *Theileria* in an equine stud-farm from Ribatejo.

Equine piroplasmosis, the only intra-erythrocytic disease in the horse, is produced by the intra-erythrocytic protozoa, *Babesia caballi* and *Theileria equi*, transmitted specially by vectors from the Ixodidae family, highly pathogenic and considered of major economical relevance. The restrictions that are imposed to the equine movement, are reflected mainly in countries traditionally producers and exporters of horses, like Portugal, endemical for this disease.

In this work, besides the clinical attendance of the equine babesiosis and theileriosis of the animals of the stud-farm of “Companhia das Lezírias”, we evaluated the blood smears from 10 mares and respective colts and fillies, that were less than 10 days of age by the time of the blood collection. This way, we evaluated the possibility of transplacental transmission of the agents of equine piroplasmosis. We also made an epidemiologic study of the disease in the equine population of this stud-farm, located in Ribatejo region, studying the blood smears from 47 animals, divided in different groups by age, sex and equine production system.

Regarding the essay about the possibility of transplacental transmission of both agents of equine piroplasmosis, we concluded that the four young horses that tested positive to *T. equi* (40%) were descendants from mares which had positive results to the same parasite and that 80% of the offspring from the 5 positive mares also had blood smears with *T. equi*. This results allowed us to confirm the existence of a possible occurrence of transplacental transmission of *T. equi*, however we could not prove the transplacental transmission of *B. caballi*.

Concerning the prevalence of the disease in the equine population of this stud-farm, we concluded that 6,38% presented positive blood smears for *B. caballi*, while the horses that tested positive for *T. equi* represented 42,55%, in a total of 48,94% positive samples. 51,06% of the animals included in this study were negative. Although our sampling may not show the exact epidemiologic reality of the stud-farm of “Companhia das Lezírias, S.A.”, the achieved results allowed us to conclude that we are in presence of a region with high levels of prevalence for this agents, particularly *T. equi*, among the equine population.

Key-words: *Babesia caballi*, *Theileria equi*, blood smear, transplacental transmission, prevalence, Lusitano Horse.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
ÍNDICE GERAL	iv
Índice de tabelas	v
Índice de figuras	v
Índice de gráficos	vi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Descrição das actividades de estágio.....	2
1.1.1. Casuística Observada.....	2
1.1.1.1. Equinos	2
1.1.1.2. Bovinos	4
2. BABESIOSE E THEILERIOSE EQUINAS	7
2.1. Definição	7
2.2. Importância Económica.....	8
2.3. Etiologia	9
2.3.1. <i>Babesia caballi</i>	9
2.3.2. <i>Theileria equi</i>	11
2.3.3. Posição Taxonómica.....	12
2.3.4. Ciclo de Vida	13
2.3.4.1. <i>Babesia caballi</i>	15
2.3.4.1.1. No Hospedeiro Invertebrado	15
2.3.4.1.2. No Hospedeiro Vertebrado.....	17
2.3.4.2. <i>Theileria equi</i>	17
2.3.4.2.1. No Hospedeiro Invertebrado	17
2.3.4.2.2. No Hospedeiro Vertebrado.....	19
2.4. Epidemiologia	20
2.4.1. Factores de Risco	24
2.4.1.1. Relativos ao Hospedeiro Vertebrado	24
2.4.1.2. Factores Ambientais	25
2.5. Imunidade e Susceptibilidade à Infecção.....	25
2.6. Patogenia.....	28
2.7. Sintomatologia e Patologia Clínica	30
2.8. Lesões Post-Mortem	33
2.9. Diagnóstico	36
2.9.1. Diagnósticos Diferenciais.....	38
2.10. Tratamento e Prognóstico.....	40
2.11. Controlo e Prevenção	42
3. OBJECTIVOS DO PRESENTE ESTUDO	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1. Caracterização da exploração agro-pecuária	46
4.1.1. Caracterização climática	47
4.1.2. Solos e vegetação.....	48
4.1.3. Sistema de produção equina	49
4.2. Amostragem.....	49
4.3. Colheita e preparação das amostras	51
5. RESULTADOS	53

5.1. Transmissão Transplacentária de <i>T. equi</i>	53
5.2. Prevalência de Piroplasmose Equina	55
5.3. Observação e exame clínico de animais naturalmente infectados	59
6. DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	64
8. BIBLIOGRAFIA	65
ANEXO 1	69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Programas profiláticos.	2
Tabela 2 – Número de animais aos quais foram realizadas acções de identificação.	3
Tabela 3 – Número de casos clínicos observados.	3
Tabela 4 – Número de pequenas cirurgias realizadas.	4
Tabela 5 – Acções de vacinação e sanidade de bovinos.	5
Tabela 6 – Percentagem relativa de casos clínicos observados em bovinos.	5
Tabela 7 – Número de cirurgias realizadas em bovinos.	6
Tabela 8 – Resultados obtidos após análise de esfregaços sanguíneos.	53
Tabela 9 – Resultados obtidos após a análise da totalidade das amostras.	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Babesia caballi</i> encontrada no esfregaço sanguíneo do equino C4.	10
Figura 2 – <i>Theileria equi</i> , num arranjo semelhante à característica “cruz de Malta”	11
Figura 3 – Classificação taxonómica clássica por Levine <i>et al.</i> (1980)	13
Figura 4 – Locais mais frequentes de fixação das carraças no hospedeiro	14
Figura 5 – Esquema do ciclo evolutivo de <i>Babesia</i> spp.	14
Figura 6 - Ciclo de vida da espécie <i>Babesia</i> na carraça e no hospedeiro vertebrado.	16
Figura 7 – Esquema do ciclo de vida de <i>T. equi</i>	18
Figura 8 – Rim de equino.	34
Figura 9 – Feto abortado evidenciando grave icterícia.	35
Figura 10 – Hepatomegália, esplenomegália e grau elevado de icterícia	35
Figura 11 – Planta de localização da “Companhia das Lezírias, S.A.”	46
Figura 12 – Grupo constituído por éguas e seus poldros, numa das pastagens.	50
Figura 13 – Equinos estabulados no Monte Braço de Prata.	50
Figura 14 – Poldros de 8 a 9 meses de idade, numa das pastagens.	50
Figura 15 – Técnica de esfregaço sanguíneo	51
Figura 16 – <i>Theileria equi</i> encontrado nos esfregaços sanguíneos de P1 e E1.	53
Figura 17 – Esfregaços sanguíneo de equino estabulado C22 e do poldro C4.	55
Figura 18– Poldra C9 e respectivo esfregaço sanguíneo.	59
Figura 19 – Equino C16 e esfregaço sanguíneo respectivo.	60

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Representação gráfica da percentagem	2
Gráfico 2 – Casuística das acções de identificação.	3
Gráfico 3 – Casuística dos casos clínicos observados.	4
Gráfico 4 – Casuística das pequenas cirurgias realizadas.	4
Gráfico 5 – Casuística das acções de vacinação e sanidade.	5
Gráfico 6 – Casuística das cirurgias realizadas.	6
Gráfico 7 – Representação da percentagem de poldros de mama, com resultados positivos e negativos na análise dos esfregaços sanguíneos, para <i>Theileria equi</i>	54
Gráfico 8 – Representação da percentagem de poldros positivos, descendentes de mães positivas	54
Gráfico 9 – Representação de éguas positivas ou negativas para <i>Theileria equi</i> e sua relação com poldros positivos ou negativos.	54
Gráfico 10 – Representação gráfica da percentagem de animais afectados.	56
Gráfico 11 – Representação gráfica da distribuição dos animais.	57
Gráfico 12 – Representação gráfica da distribuição dos animais positivos	57
Gráfico 13 – Representação gráfica da percentagem encontrada	58
Gráfico 14 – Representação gráfica da percentagem de animais negativos e positivos, considerando cada um dos agentes pesquisados, na amostragem analisada.	58

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CL	Companhia das Lezírias, S.A.
%	percentagem
DROC	doença respiratória obstrutiva crónica
DRB	doença respiratória bovina
<i>B.</i>	<i>Babesia</i>
<i>T.</i>	<i>Theileria</i>
µm	micrómetro
<i>Babesia</i> spp.	espécies de <i>Babesia</i>
<i>Theileria</i> spp.	espécies de <i>Theileria</i>
IFI	imunofluorescência indirecta de anticorpos
FC	fixação do complemento
°C	graus Celsius
SCID	imunodeficiência combinada grave
NO	monóxido de azoto
CID	coagulação intravascular disseminada
cTnI	troponina cardíaca I
CK-MB	fracção MB da creatina fosfoquinase
Milhões/µl	milhões por microlitro
g/dl	gramas por decilitro
ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase

GGT	gama glutamil transpeptidase
CK	creatina fosfoquinase
IgG	imunoglobulina G
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
PCR	polymerase chain reaction
ml	mililitro
LD ₅₀	dose letal 50
mg/kg	miligrama por quilograma
ml/100kg	miligrama por 100 quilograma
IM	intramuscular
IV	intravenoso
1000X	1000 vezes
100X	100 vezes
kms	quilómetros
ha	hectare
°	graus
N	Norte
W	Oeste
m	metro
mm/ano	milímetro por ano
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>

1. INTRODUÇÃO

O curso de Mestrado em Medicina Veterinária culmina com a realização de um estágio curricular, que engloba uma componente prática, que deverá corresponder a um período mínimo de 500 horas, bem como a preparação de uma dissertação e sua defesa em provas públicas.

O estágio referido foi realizado na “Companhia das Lezírias, S.A.” (CL), sob a orientação científica do Dr. António Carlos Pinto Farrim, na área de clínica de equinos.

Para além da clínica de equinos, e aproveitando os recursos proporcionados pela CL que, para além de cerca de 150 equinos, goza ainda de um efectivo bovino com aproximadamente 4000 bovinos de carne, bem como cerca de 30 ovinos, realizei também actividades na área de clínica e sanidade animal destas espécies.

Neste estágio curricular, que decorreu entre 1 de Novembro de 2007 e 1 de Abril de 2008, acompanhei diariamente o Dr. António Farrim nas suas consultas, sendo-me permitido realizar as mais variadas tarefas, tanto de diagnóstico como de tratamento, bem como a execução de tarefas relacionadas com gestão de efectivo, programas de sanidade e de profilaxia animal. Uma vez que o orientador referido é um veterinário creditado pela Fédération Equestre Internationale (FEI) e pela Federação Equestre Portuguesa (FEP), tive a possibilidade de participar também nas grelhas veterinárias de diversos concursos equestres, realizados pela FEP.

Durante este período pretendeu-se aplicar os conhecimentos adquiridos ao longo do curso a situações práticas, bem como a aquisição de novos conhecimentos, para além de me ter sido permitido contactar com a realidade da clínica de equinos e grandes animais do nosso país, concedendo-me bases sólidas para o meu desenvolvimento futuro como Médico Veterinário.

O tema escolhido para a dissertação de mestrado, foi-me sugerido pelo Dr. António Farrim pela importância que a babesiose e theileriose têm na população equina nacional, e pelo facto de poucos estudos terem sido realizados sobre esta temática em Portugal. Procedeu-se assim ao “Estudo da infecção natural por protozoários dos géneros *Babesia* e *Theileria* numa exploração coudélica do Ribatejo”.

1.1. DESCRIÇÃO DAS ACTIVIDADES DE ESTÁGIO

1.1.1. CASUÍSTICA OBSERVADA

A descrição da casuística observada durante o período de estágio encontra-se dividida em duas áreas: equinos e bovinos. Em cada uma destas áreas será apresentada a respectiva casuística, sob a forma de análise percentual.

1.1.1.1. EQUINOS

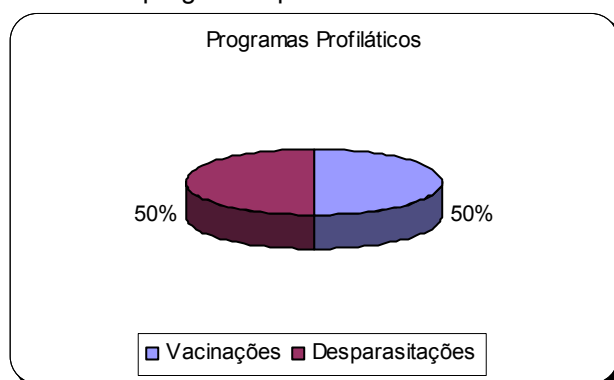
Relativamente às diferentes actividades desenvolvidas na área da clínica de equinos, estas encontram-se divididas em programas profiláticos, acções de identificação animal, casos clínicos observados e cirurgias realizadas.

Todos animais que foram sujeitos aos programas de vacinação implementados na coudelaria foram simultaneamente submetidos a desparasitação (Tabela 1). Na exploração em questão todos os animais adultos são vacinados anualmente contra o tétano e influenza equina com a vacina ProteqFlu-Te ® (Merial). A primovacinação é realizada aos 5-6 meses de idade, aquando do desmame, com reforço após 5 a 6 semanas, seguindo-se as revacinações anuais. Quanto às desparasitações, estas são realizadas com a administração de produtos à base de Ivermectina e Praziquantel (Equimax® (Virbac)).

Tabela 1 – Programas profiláticos.

	Nº Animais
Vacinações	18
Desparasitações	18

Gráfico 1 – Representação gráfica da percentagem dos programas profiláticos realizados.



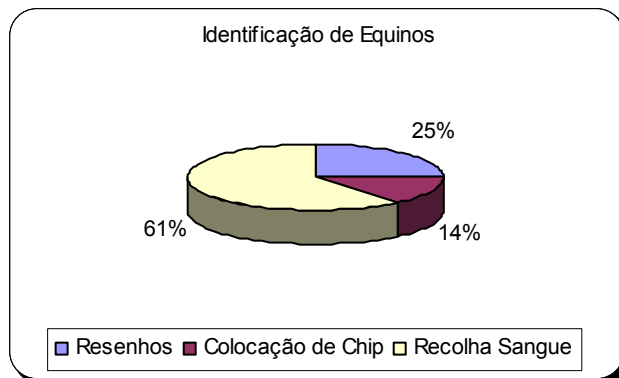
A tabela 2, bem como o gráfico 2, são ilustrativos das diferentes acções de identificação de equinos realizadas ao longo dos 5 meses de estágio, nomeadamente resenhos para

documentação oficial (provisórios e definitivos), colocação de “chip” e colheitas sanguíneas com o propósito de inscrição de animais no “stud-book” da raça puro sangue Lusitano.

Tabela 2 – Número de animais aos quais foram realizadas acções de identificação.

	Nº Animais
Resenho	25
Colocação de Chip	14
Recolha Sangue	61

Gráfico 2 – Casuística das acções de identificação.

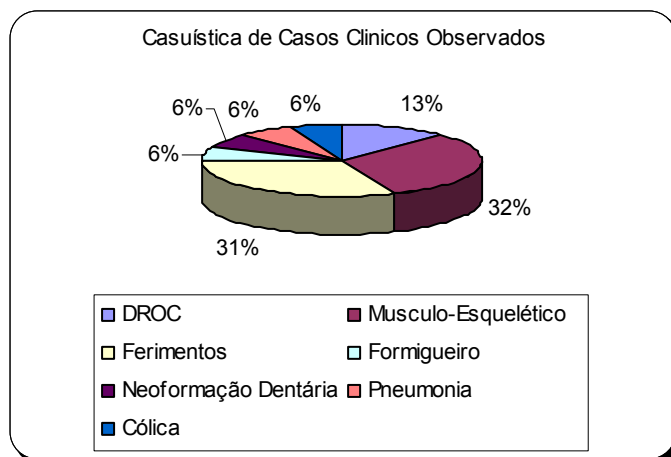


Na realização deste estágio, tive a oportunidade de observar diversos casos clínicos que ocorreram em animais propriedade da Coudelaria da Companhia das Lezírias, participando activamente no seu diagnóstico e resolução, descritos na tabela 3, e analisados percentualmente no gráfico 3.

Tabela 3 – Número de casos clínicos observados.

	Nº Animais
DROC	2
Musculo-Esquelético	5
Ferimentos	5
Formigueiro	1
Neoformação Dentária	1
Pneumonia Bacteriana	1
Cólica	1

Gráfico 3 – Casuística dos casos clínicos observados.

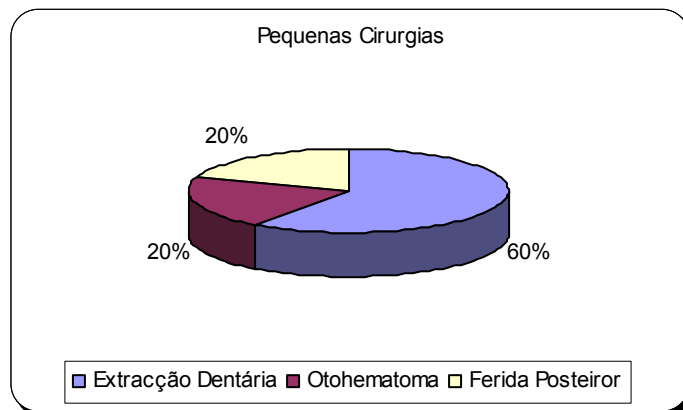


As pequenas cirurgias (Tabela 4 e Gráfico 4) realizadas em maior percentagem foram as extracções dentárias (60%), seguidas pela resolução de otohematoma e de sutura de ferimento no membro posterior.

Tabela 4 – Número de pequenas cirurgias realizadas.

	Nº Animais
Extracção Dentária	3
Otohematoma	1
Ferimento Membro Posteiror	1

Gráfico 4 – Casuística das pequenas cirurgias realizadas.



1.1.1.2. BOVINOS

Nesta área de intervenção dividimos as actividades realizadas em acções de vacinação e sanidade, casos clínicos observados e cirurgias realizadas.

Na tabela e gráfico 5 encontra-se descrito o número de animais, bem como a sua análise percentual, sujeitos às acções de vacinação e sanidade durante este período de estágio.

Os programas vacinais implementados são sobretudo indicados para as clostridioses, sendo realizadas ao desmame, com reforço anual. Na entrada dos animais para o feedlot, as medidas profiláticas executadas foram dirigidas para os agentes implicados na doença respiratória bovina (DRB), principalmente para o vírus da diarreia viral bovina, o vírus da

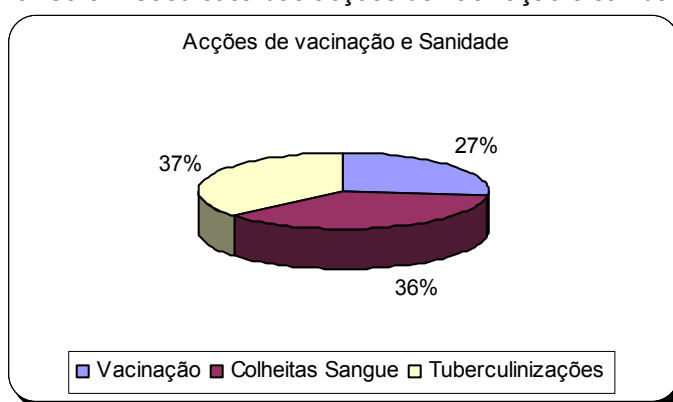
parainfluenza 3, o vírus respiratório sincicial bovinos e o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos.

Foram efectuadas colheitas de sangue a 455 bovinos adultos para pesquisa de brucelose, leucose enzoótica bovina... e realizadas 455 provas de intradermotuberculinização para a pesquisa de tuberculose, através de prova comparada com tuberculina bovina (*Mycobacterium bovis*) e aviária (*Mycobacterium avium*).

Tabela 5 – Acções de vacinação e sanidade de bovinos

	Nº de Animais
Vacinação	330
Colheitas Sangue	455
Tuberculinizações	455

Gráfico 5 – Casuística das acções de vacinação e sanidade.



Relativamente aos casos clínicos presenciados durante o período de estágio, estes encontram-se resumidos na tabela 6, sob a forma de análise percentual.

Tabela 6 – Percentagem relativa de casos clínicos observados em bovinos.

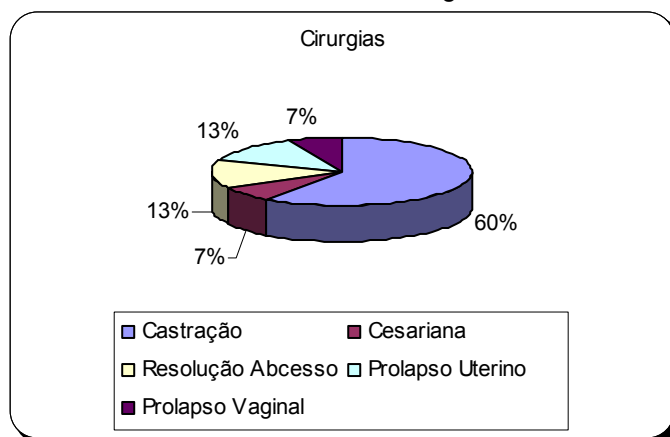
	Percentagem
Pneumonia	1,06%
Trauma Membros	5,32%
Hepatose Crónica	2,13%
Enfisema Subcutâneo	1,06%
Quertoconjuntivite Infecciosa	1,06%
Diarreia Bezerros	78,72%
Tratamento de grupo	1,06%
Babesiose	3,19%
Síndrome da vaca caída	1,06%
Carcinoma cutâneo	1,06%
Enterotoxémia	1,06%
Necrópsia	1,06%
Eutanásia	2,13%

Por último, encontra-se descrito na tabela 7 as diferentes intervenções cirúrgicas realizadas em bovinos de carne, propriedade da Companhia das Lezírias, bem como a respectiva análise percentual (Gráfico 6).

Tabela 7 – Número de cirurgias realizadas em bovinos.

	Nº Animais
Castração	9
Cesariana	1
Resolução Abcesso	2
Prolapso Uterino	2
Prolapso Vaginal	1

Gráfico 6 – Casuística das cirurgias realizadas.



2. BABESIOSE E THEILERIOSE EQUINAS

2.1. DEFINIÇÃO

A babesiose e theileriose equinas, consideradas as únicas doenças intra-eritrocitárias dos equinos (Nogueira *et al.*, 2005), são afecções que atingem os membros da família Equidae, sendo transmitidas principalmente por vectores da família Ixodidae e produzidas por parasitas protozoários intra-eritrocitários pertencentes ao género *Babesia*, da ordem Piroplasmida, à qual devem o nome piroplasmose equina, pelo qual são bem conhecidas (Navarrete & Serrano, 1999). Embora a designação piroplasmose equina tenha caído em desuso, ao longo deste trabalho esta é utilizada por forma a simplificar o discurso, evitando-se a denominação babesiose e theileriose equinas.

Trata-se de uma afecção produzida por duas espécies diferentes de protozoários, *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1910) e *Babesia equi* (Laveran, 1901) com diferentes formas de vida e capacidade de acção patogénica distinta, entre as quais não existe imunidade cruzada. Recentemente, *B. equi* foi reclassificada, como *Theileria equi* (Melhorn & Schein, 1998), pelo facto do organismo apresentar estádios exo-eritrocitários (em linfócitos) no hospedeiro vertebrado, com o desenvolvimento de microesquizontes e macroesquizontes, o que o aproxima de membros do género *Theileria* (Zaugg, 2002). Em concordância com estes factos, será admitido neste trabalho a nomina *Theileria equi*.

Aparentemente, todos os equídeos são susceptíveis a ambas as espécies parasitas. No entanto, em África, a zebra é infectada naturalmente com *T. equi*, mas não com *B. caballi*, constituindo um importante reservatório da doença no antigo continente (Zaugg, 2002). As babesioses são consideradas endémicas em 90% de todo o mundo, com apenas o Canadá, os Estados Unidos, Austrália, Japão, Inglaterra e Irlanda a não serem considerados endemicamente afectados (American Veterinary Medical Association [AVMA], 2006).

Uma característica da babesiose é poder ser transmitida através de sangue contaminado, havendo, por esta razão, a possibilidade de ser transmitida acidentalmente por fomites contaminados, ou iatrogenicamente, através de instrumentos veterinários contaminados, para além da transmissão pelas, já referidas, carraças (Roncati, 2006). Pode, também, ocorrer infecção intrauterina dos poldros, através da passagem de eritrócitos parasitados pela barreira placentária, e que parece ser relativamente comum em áreas endémicas (AVMA, 2006; Portz *et al.*, 2007). Éguas prenhas podem abortar como resultado destas infecções (De Waal & Van Heerden, 2004).

A infecção por estes organismos pode evoluir de forma aguda, sub-aguda ou crónica, (Ali, Sugimoto & Onuma, 1996) sendo caracterizada por sinais tais como febre, anemia, icterícia, hemoglobinúria, depressão, anorexia e podendo mesmo conduzir à morte (Radostits *et al.*,

2007). Contudo, a sintomatologia é normalmente inespecífica, pelo que a doença poderá ser confundida com uma grande variedade de condições (De Waal & Van Heerden, 2004).

2.2. IMPORTÂNCIA ECONÓMICA

A piroplasmose equina tem sido citada como a principal parasitose equina devido aos danos directos (perdas de performance, mortalidade) e indirectos (impedimento para comercialização, viagem para o exterior) causados à sanidade animal (Nogueira *et al.*, 2005).

As implicações económicas relacionadas com a piroplasmose equina incluem restrições impostas à exportação ou participação em eventos desportivos internacionais, os custos do tratamento, especialmente de casos agudos, os abortos, a perda de performance, e a taxa de mortalidade (Kerber, Ferreira & Ferreira, 1999). Num estudo levado a cabo na África do Sul, concluiu-se que o número de casos de piroplasmose tratados excederam os casos de qualquer outra doença infecciosa equina, incluindo as doenças infecciosas respiratórias e a peste equina africana (De Waal & Van Heerden, 2004). Para além destas situações, a taxa de mortalidade em surtos de piroplasmose equina é elevada, sendo a ocorrência de morte de poldros infectados, ainda a nível intra-uterino, uma outra causa importante de perdas causada por esta afecção (Radostits *et al.*, 2007).

Recentemente, o movimento internacional de equinos tem aumentado a importância desta doença devido ao risco da sua transmissão de animais portadores para populações susceptíveis (Kerber *et al.*, 1999). Animais apresentando resultados positivos nos exames serológicos para a detecção de anticorpos contra as espécies *Babesia caballi* ou *Theileria equi* são impedidos de entrar em muitos países livres da doença. Por estes motivos, a doença traduz-se em perdas económicas consideráveis, representadas pelo impedimento do transporte de equinos entre países, nomeadamente, com a finalidade de participarem em competições internacionais. Como exemplo desta problemática, recorde-se o que sucedeu durante os Jogos Olímpicos de 1996, em Atlanta, em que cavalos detectados com anticorpos para os agentes responsáveis pela piroplasmose, provenientes de áreas endémicas, apenas foram autorizados a competir em eventos de dressage e saltos, realizados em estádio. Foi impedida a sua participação nas fases da competição realizadas em zonas de campo, devido às preocupações com a presença de carraças nesses locais. Estes animais foram estabulados isoladamente e foi promovido um apertado controlo dos vectores. Medidas semelhantes foram realizadas nos Jogos Olímpicos de Sidney, no ano 2000, na Austrália (AVMA, 2006; Radostits *et al.*, 2007).

No que se refere às limitações impostas ao comércio, estas reflectem-se sobretudo em países tradicionalmente produtores e exportadores de cavalos, como é o caso de Portugal. A piroplasmose equina é uma das principais razões pela qual é impedida a importação de

equinos provenientes do nosso país para países indemnes da doença, inviabilizando inúmeras oportunidades de negócio e possibilidades de maior divulgação do cavalo Puro Sangue Lusitano. Por este motivo, o controlo desta doença representaria um papel importante na abertura do mercado internacional para a indústria equina nacional.

2.3. ETIOLOGIA

A piroplasmose equina, também conhecida como febre biliar, é uma doença dos equinos transmitida por carraças, causada pelos protozoários intra-eritrocitários *Babesia caballi* e *Theileria equi* (De Waal & Van Heerden, 2004). Os parasitas são transmitidos, principalmente, por vectores da família Ixodidae, nomeadamente, no caso das infecções nos equinos, *Dermacentor* spp., *Hyalomma* spp. e *Rhipicephalus* spp. (Urquhart *et al.*, 1996; Navarrete & Serrano, 1999). A piroplasmose é uma doença infecciosa transmitida através da saliva da carraça, quando esta realiza o seu repasto sanguíneo. Para além da transmissão por estes agentes, as carraças podem também inocular toxinas, transmitir vírus, riquetsias e bactérias (Costa, 2005).

Nos relatos iniciais de piroplasmose equina, pouco esforço foi realizado no sentido de determinar se a infecção era causada por *T. equi* ou *B. caballi*, sendo as infecções descritas como uma única doença. No entanto, com o passar do tempo, tornaram-se evidentes as diferenças entre ambos os agentes, particularmente no que se refere à sua morfologia, ciclo de vida, vectores e susceptibilidade à quimioterapia. Por estes motivos é importante a diferenciação entre infecções provocadas por *T. equi* e *B. caballi* (De Waal & Van Heerden, 2004), podendo, contudo, ambos os parasitas infectar um animal concorrentemente (The Center of Food Security & Public Health [CFSPH], 2003).

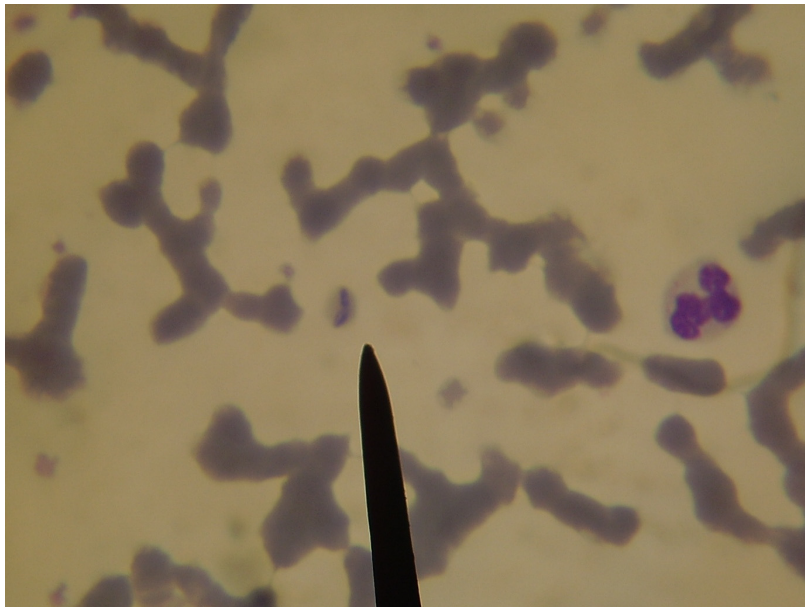
O reconhecimento de ambas as espécies é actualmente possível através da observação das diferenças morfológicas e morfométricas, bem como recorrendo às identificações isoenzimática e imunológica (Navarrete & Serrano, 1999). A observação de esfregaços sanguíneos mostra que os organismos, tipicamente piriformes, se encontram no interior dos eritrócitos, normalmente isolados ou formando pares, ligados pelas suas pontas mais afiladas (Urquhart *et al.*, 1996).

2.3.1. *Babesia caballi*

A *Babesia caballi*, pertencente ao grupo das grandes *babesias*, assemelha-se à *B. bigemina*, que atinge os bovinos (Navarrete & Serrano, 1999; Zaugg, 2002). Os merozoítos encontrados nos eritrócitos são em forma de pêra, encontrando-se frequentemente em pares ligados pelas suas pontas posteriores, formando um ângulo agudo, no interior do mesmo eritrócito (figura 1) e usualmente nunca em número maior que dois (Navarrete & Serrano, 1999). Estes merozoítos variam de tamanho, entre 2 a 5 µm em comprimento e

entre 1 a 1,5 μm de largura. Os trofozoítos são polimórficos, predominando as formas redondas, ovais ou elípticas com diâmetros compreendidos entre os 1,5 e 3 μm (De Waal & Van Heerden, 2004).

Figura 1 – *Babesia caballi* encontrada no esfregaço sanguíneo do equino C4.
Ampliação: 1000X (Original).



A espécie *B. caballi* comporta-se, no seu ciclo evolutivo, como uma autêntica *Babesia*, isto é, com as suas fases de gametogonia e esporogonia ocorrendo no hospedeiro invertebrado, e uma fase de multiplicação assexual ocorrendo, exclusivamente, nos glóbulos vermelhos do hospedeiro vertebrado (Navarrete & Serrano, 1999). O parasita divide-se assexualmente, por divisão binária, que consiste na divisão de uma célula originando duas células filhas, no interior dos eritrócitos ocorrendo, posteriormente, a rotura da célula hospedeira e a libertação dos organismos que irão penetrar em novos eritrócitos (Urquhart *et al.*, 1996).

A infecção por *B. caballi* é transmitida pelo hospedeiro invertebrado, de forma transovárica, ou seja, da fêmea da carraça para a geração seguinte, ocupando os seus tecidos, especialmente o ovário, onde invadem os ovos. Subsequentemente, continuam a multiplicar-se nos tecidos das larvas eclodidas, assegurando que as formas de *Babesia* spp. sejam transmitidas por estadios da geração seguinte da carraça. Todos os estadios da prole subsequente terão capacidade de transmitir o agente aos equídeos (Costa, 2005).

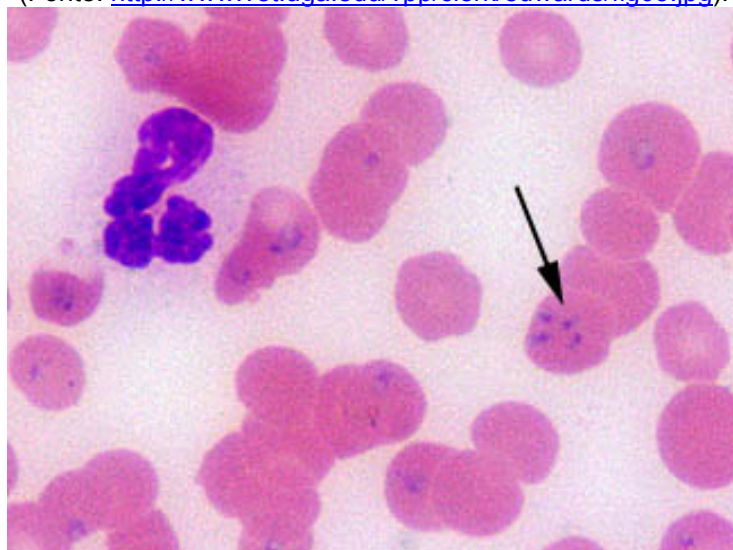
Quando comparada com a outra espécie, *B. caballi* possui uma menor actividade patogénica e diferente sensibilidade a quimioterápicos, apresentando-se sensível a produtos para tratamento de babesiose (Navarrete & Serrano, 1999; Office International des Épizooties [OIE], 2004).

2.3.2. *Theileria equi*

No que se refere à *Theileria equi*, ao contrário do que sucede com as restantes espécies de *Babesia*, esta apresenta, aparentemente, um estadio de esquizogonia em células linfocitárias do hospedeiro vertebrado, motivo pelo qual se assemelha a parasitas taxonomicamente próximos, pertencentes ao género *Theileria*. É esse estadio linfocitário que causa algumas das manifestações mais graves das infecções por *Theileria*, tais como linfadenopatia, pirexia, trombocitopenia e panleucopenia (Homer *et al.*, 2000). A formação de merozoítos nos linfócitos ocorre em doze a catorze dias, após a infestação de animais susceptíveis por carraças infectadas, sendo então libertados para invadir os eritrócitos. Estes merozoítos, de forma arredondada ou amebóide, apresentam-se no interior dos eritrócitos, em número de dois a quatro parasitas, num arranjo conhecido, neste último caso, como “Cruz de Malta” (figura 2), importante característica deste agente, que facilita a sua observação microscópica em esfregaços sanguíneos (Navarrete & Serrano, 1999; Zaugg, 2002; De Waal & Van Heerden, 2004).

No hospedeiro invertebrado, este agente é transmitido transtadialmente, isto é, ao ser incorporado no organismo por um estadio evolutivo da carraça, transmitir-se-á através dele aos estadios seguintes. (Navarrete & Serrano, 1999). Neste tipo de transmissão, ao se iniciar a alimentação do estadio seguinte da carraça, os esporontes (formas jovens) que são encontrados nas glândulas salivares, desenvolvem-se, e transformam-se em formas infectantes, os esporozoítos (Urquhart *et al.*, 1996). A infecção é, assim, transmitida pela ninfa, caso tenha sido a larva a infectar-se, ou pelo adulto, se foi a ninfa que se infectou (Navarrete & Serrano, 1999).

Figura 2 – *Theileria equi*, num arranjo semelhante à característica “cruz de Malta” (seta), encontrada num esfregaço sanguíneo. Ampliação: 2000X
(Fonte: <http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/edwards/fig03.jpg>).



Apesar da sua posição taxonómica permanecer incerta, devido a algumas características da espécie *T. equi*, tais como o seu ciclo extra-eritrocitário, o seu reduzido tamanho e a

ausência de transmissão transovárica, para propósitos práticos, é ainda considerada como um “pequeno” parasita semelhante a *B. bovis* em esfregaços sanguíneos, de tamanho inferior à *B. caballi*, com apenas 1,5 µm de comprimento (Navarrete & Serrano, 1999; Zaugg, 2002; De Waal & Van Heerden, 2004).

2.3.3. POSIÇÃO TAXONÓMICA

A classificação taxonómica das espécies de *Babesia* colocam “estes seres eucariotas” (Allsopp & Allsopp, 2006), segundo Levine *et al.* (1980), dentro do Reino Protista, no filo Apicomplexa, subclasse Piroplasmia, e na ordem Piroplasmida (figura 3). Possuem organelos apicais, um estadio merogónico nos eritrócitos do hospedeiro vertebrado, e desenvolvimento sexual e formação de esporozoítos no hospedeiro invertebrado, que no caso do género *Babesia* apenas foi descrito em carraças. O exame microscópico de esfregaços sanguíneos corados de hospedeiros vertebrados infectados mostra que algumas das espécies de *Theileria* e *Babesia* apresentam uma forma de pêra característica no interior dos eritrócitos. Esta observação conduziu ao uso do nome “piroplasma” para descrever membros de ambos o géneros.

Duas das famílias pertencentes à ordem Piroplasmida são a *Babesiidae* e a *Theileriidae*, sendo as principais diferenças entre elas, a ausência de um ciclo pré-eritrocitário na *Babesia*, e a ausência de transmissão transovárica no caso da *Theileria* (Homer *et al.*, 2000). As descrições da existência de ciclos pré-eritrocitários no caso da *B. equi* levou, recentemente, à sua reclassificação, por Melhorn & Schein (1998), para *T. equi* (Kerber *et al.*, 1999).

Inicialmente, as espécies do género *Babesia* eram identificadas baseando-se apenas em parâmetros morfológicos das formas intraeritrocitárias visíveis em esfregaços sanguíneos de animais infectados, visto o microscópio ser a única ferramenta disponível para o estudo dos piroplasmas. Esta análise, juntamente com a especificidade para o hospedeiro, permitiu a classificação de diversas espécies. Suspeita-se, no entanto, que muitas destas descrições possam ser de espécies similares ou idênticas, que os métodos tradicionais seriam incapazes de distinguir.

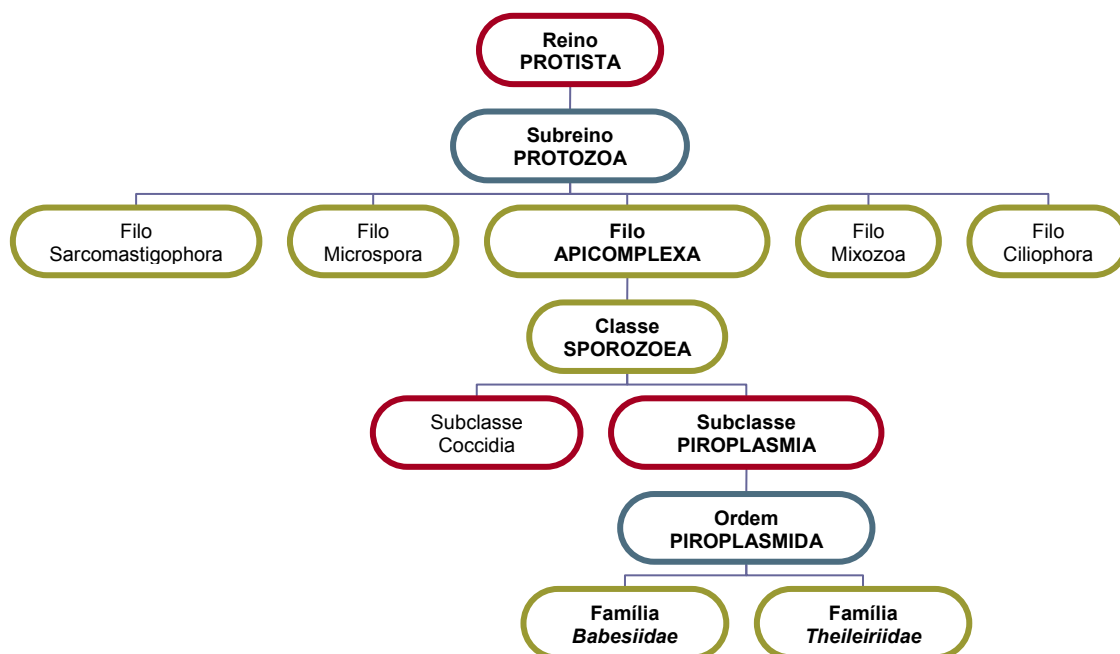
Por diversos motivos, estes métodos de classificação tradicional encontram-se gradualmente a ser substituídos por métodos de biologia molecular desenvolvidos mais recentemente, que são úteis na diferenciação entre organismos similares e na confirmação de distinções baseadas em características mais subjectivas. Situações como: (i) diferentes parasitas se assemelharem morfolologicamente, no mesmo hospedeiro, (ii) do mesmo parasita poder ter aparência microscópica diferente em diferentes hospedeiros (provavelmente devido a factores hospedeiro-específicos) e (iii) de espécies, como a *B. microti*, terem revelado a capacidade de infectar uma grande variedade de hospedeiros, são

razões que justificam a utilização de métodos de análise molecular para a classificação das espécies de *Babesia*.

Informalmente, os parasitas do género *Babesia* encontram-se agrupados em pequenas e grandes *Babesias* (como a *B. caballi* e *B. bovis*), encontrando-se as pequenas mais relacionadas com *Theileria*, como é o caso da espécie *T. equi* e *B. microti*. O facto de nenhuma das pequenas espécies de *Babesia* parecer ser transmitida transovaricamente nas carraças, conduziu à sugestão de que estas deveriam ser classificadas juntamente com as espécies pertencentes à família *Theileria* (Homer *et al.*, 2000; Allsopp & Allsopp, 2006).

Futura avaliação genética deverá ajudar a clarificar a relação entre os dois géneros e conduzir a um melhor entendimento acerca da posição taxonómica de espécies como *T. equi* e *B. microti*.

Figura 3 – Classificação taxonómica clássica por Levine *et al.* (1980), reduzida aos grupos de interesse (Adaptado de: Navarrete & Serrano, 1999).

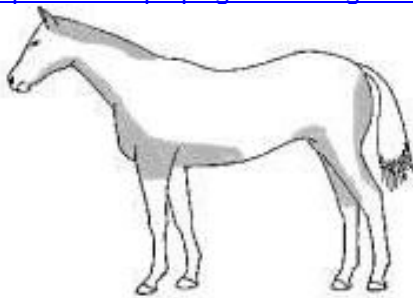


2.3.4. CICLO DE VIDA

Os Apicomplexa (incluindo o género *Babesia* e o seu parente próximo *Theileria*), geralmente passam, pelo menos, por três estádios de reprodução: (i) gamogonia – formação e fusão de gâmetas no intestino da carraça, (ii) esporogonia – reprodução assexuada nas glândulas salivares do hospedeiro invertebrado, e (iii) merogonia – reprodução assexuada no hospedeiro vertebrado (Homer *et al.*, 2000).

As carraças são encontradas no animal em zonas de pele fina, tais como a cabeça, o baixo ventre, as axilas e bragadas, mas podem também invadir o pescoço, as espáduas e outras regiões (figura 4) (Campillo, 1999). Nos sistemas de criação de puro sangue Lusitano em pastoreio é muito vulgar encontrar fortes infestações na zona perineal e nos pavilhões auriculares (Madeira de Carvalho, comunicação pessoal).

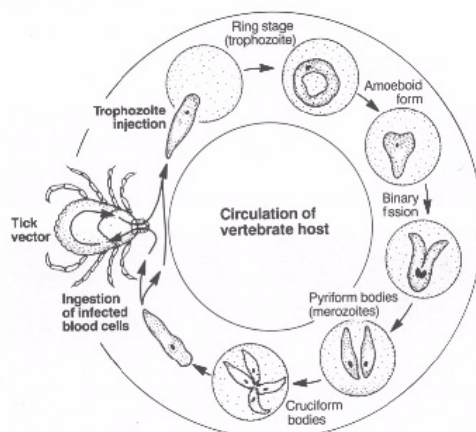
Figura 4 – Locais mais frequentes de fixação das carraças no hospedeiro (zonas a cinzento)
(Fonte: <http://www2.dpi.qld.gov.au/images/12101.jpg>).



No local de fixação do vector produzem-se várias lesões, tais como hemorragias, edema e pápulas, deixando uma depressão crateriforme quando a carraça se desprende, o que pode funcionar como porta de entrada de invasões bacterianas e de miasas. Caso sejam extraídas manualmente, e se deixarem peças bucais no local da ferida, pode ocorrer a formação de abscessos (Campillo, 1999).

As carraças adultas e ninfas têm capacidade de transmitir a doença. Estes vectores ao succionarem sangue, para se alimentarem, de um hospedeiro parasitado, ingerem eritrócitos infectados (figura 5). Os eritrócitos são digeridos no seu aparelho digestivo, libertando micromerozoítos que, por reprodução sexual, resultam na produção de zigotos. Os zigotos evoluem para esporozoítos, que sofrem divisão, difundindo-se através da hemolinfa para as suas glândulas salivares, inoculando-os num novo hospedeiro vertebrado susceptível, após aproximadamente dois a cinco dias de permanência sobre este (Navarrete & Serrano, 1999; AVMA, 2006).

Figura 5 – Esquema do ciclo evolutivo de *Babesia* spp. (Nota: não está representada a fase linfocitária de *T. equi*) (Fonte: http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/babe_life.html).



Como foi já referido, a grande diferença entre ambos os protozoários, responsáveis pela piroplasmose equina, encontra-se no facto da espécie *B. caballi*, no hospedeiro invertebrado, se comportar como uma verdadeira babesia, ou seja, apresentando transmissão transovárica, enquanto que a *T. equi* se transmite transtadialmente. Além disso, no hospedeiro vertebrado, a primeira desenvolve o seu ciclo apenas nos glóbulos

vermelhos, ao passo que a segunda tem, previamente à fase eritrocitária, uma fase com multiplicação do tipo merogónico em células linfocitárias (Navarrete & Serrano, 1999).

2.3.4.1. *Babesia caballi*

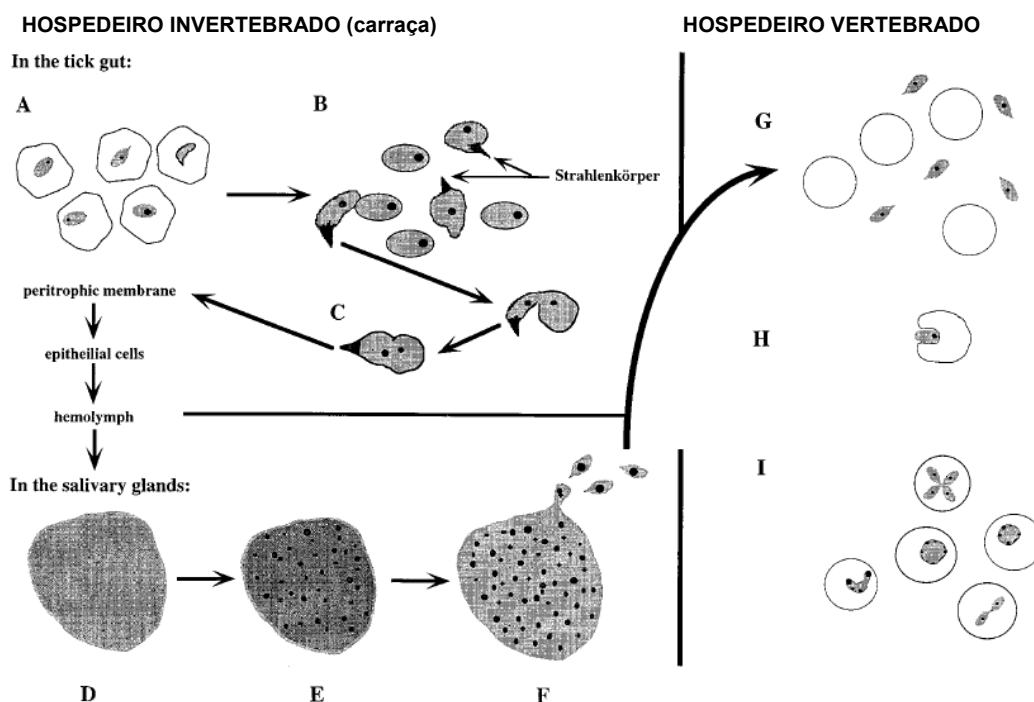
2.3.4.1.1. NO HOSPEDEIRO INVERTEBRADO

O desenvolvimento inicial de *B. caballi* no hospedeiro invertebrado tem lugar nas células epiteliais do intestino, da fêmea engorgitada. Ciclos sucessivos de gametogonia ocorrem e uma grande variedade de tipos celulares, incluindo os ovos, tornam-se infectados. Os ooquistos resultantes, e depois os ovos de *B. caballi* penetram nas glândulas salivares por altura da muda das larvas (6 a 10 dias após fixação) e desenvolvem-se para formarem esporozoítos (as formas infectantes) pouco tempo após as ninfas se começarem a alimentar. Estes esporozoítos, de forma oval ou piriforme, com 2,5 a 3 µm de comprimento, são libertados no lúmen da glândula salivar. Pensa-se que sejam injectados enquanto as ninfas se alimentam. Há também indicações de que a infecção possa ser transmitida, para além de transovariamente, também da ninfa para o adulto para a geração seguinte (De Waal & Van Heerden, 2004).

Os organismos são observados na carraça cerca de 10 horas após o vector ter iniciado a sua refeição no hospedeiro vertebrado, e após 46 a 60 horas os parasitas continuam detectáveis ainda no interior dos eritrócitos consumidos pela carraça (figura 6A), enquanto alguns destes, os gametócitos, começam já a diferenciar-se em novos organelos. É formado um organelo em forma de ponta de lança, na extremidade anterior do organismo, denominado Strahlenkörper (figura 6B). Esta estrutura foi encontrada em todas as infecções por *Babesia* e *Theileria* spp. e parece estar envolvida na fusão dos gametas. O zigoto resultante (figura 6C) usa esta estrutura na entrada para as células epiteliais do intestino da carraça, aproximadamente 80 horas após iniciarem a alimentação no hospedeiro. Destas células epiteliais, os parasitas movem-se para os ácinos das glândulas salivares, através da hemolinfa.

O desenvolvimento dos esporozoítos na glândula salivar pode ser dividido em três fases. Primeiro, o parasita expande-se e preenche a célula hospedeira hipertrofiada (figura 6D), formando um esporoblasto multinucleado, de onde os esporozoítos irão brotar. O segundo passo inicia-se apenas após a carraça hospedeira voltar a alimentar-se, promovendo a formação dos organelos especializados dos futuros esporozoítos, como micronemas, roptrias e segmentos de dupla membrana sob a membrana plasmática (figura 6E). Finalmente, os esporozoítos maduros formam-se através de um processo de germinação (figura 6F), apresentando aproximadamente 2,2 por 0,8 µm de tamanho e forma piriforme. Aproximadamente 5000 a 10000 esporozoítos podem ser produzidos a partir de apenas um esporoblasto.

Figura 6 - Ciclo de vida da espécie *Babesia* na carraça e no hospedeiro vertebrado (não estão representadas as fases pré-eritrocitárias observadas nas espécies de *Theileria* e na *Theileria equi*)
(Adaptado de: Homer *et al.*, 2000).



Os acontecimentos na carraça começam com os parasitas ainda visíveis no interior dos eritrócitos consumidos (A). Alguns iniciam o desenvolvimento de macro e microgâmetas, e os gâmetas libertados começam a fundir-se (B). O zigoto então formado irá infectar e dirigir-se, através de outros tecidos, para as glândulas salivares da carraça (C). Uma vez infectados os ácinos salivares, é formado um esporoblasto multinucleado, mas indiferenciado (D). Após a carraça iniciar a refeição no hospedeiro vertebrado, formam-se os organelos especializados dos futuros esporozoítos (E). Finalmente, os esporozoítos maduros germinam do esporoblasto (F). Enquanto a carraça se alimenta no hospedeiro vertebrado, estes esporozoítos são inoculados no animal (G). Os esporozoítos contactam os eritrócitos do hospedeiro e iniciam o processo de infecção por invaginação (H). Os parasitas transformam-se em trofozoítos e através da divisão binária no interior do eritrócito, criam as diferentes formas de merozoítos observadas nos esfregaços sanguíneos (I).

A eficiência da transmissão pela carraça está atribuída à sua saliva, que provavelmente facilita a infecção através da sua acção farmacológica anti-inflamatória ou imunossupressiva.

“Grandes” *Babesias*, como é o caso de *B. caballi*, podem ser transmitidas transovariamente. Após os zigotos (também denominados vermículos) terem entrado na hemolinfa, estes invadem outras células, tais como células adiposas ou nefrócitos, e são submetidos a um segundo ciclo de divisão. Estes zigotos secundários podem invadir os ovários e serem transmitidos transovariamente. Este modo de transmissão pode teoricamente resultar num maior número de carraças infectadas em áreas onde as espécies de *Babesia* são endémicas (Homer *et al.*, 2000).

Segundo um estudo, levado a cabo por Mujica *et al.* (2004), foi demonstrado que *B. caballi* para além de induzir doença no hospedeiro vertebrado, é também patogénico para o hospedeiro invertebrado *Anocentor nitens*, vector de *B. caballi* no continente Americano. Observou-se uma relação directa entre o grau de infecção da carraça e a sua mortalidade nos dias seguintes à separação do hospedeiro.

2.3.4.1.2. NO HOSPEDEIRO VERTEBRADO

A *Babesia caballi* desenvolve-se no hospedeiro vertebrado, exclusivamente, nos seus eritrócitos (De Waal & Van Heerden, 2004).

O período de tempo que a carraça permanece fixa ao hospedeiro vertebrado, afecta directamente a eficácia da transmissão dos esporozoítos. Caso seja permitido que a carraça se alimente até que esteja repleta, a taxa de infecção aproxima-se de 100% (Costa, 2005). Uma vez introduzidos num animal susceptível, os esporozoítos invadem os glóbulos vermelhos e iniciam uma fase de reprodução assexual, originando merozoítos. Estes merozoítos ou esporozoitos invadem o eritrócito hospedeiro através de um processo de invaginação, formando um vacúolo parasitóforo. A membrana deste vacúolo desintegra-se gradualmente, até que o parasita se apresente com a sua estrutura característica de piroplasma, com uma única membrana, diferenciando-se das espécies de *Plasmodium*, que ao invadirem as células através de um processo semelhante, retêm a membrana hospedeira, para além da sua própria membrana.

No interior dos eritrócitos do hospedeiro, a maioria dos esporozoítos transforma-se em trofozoítos. Por divisão binária o trofozoíto origina dois organismos piriformes, com 2 a 5 µm de comprimento e 1 a 1,5 µm de largura, denominados merozoítos. Este tipo de reprodução assexual produz mais merozoítos, que irão lisar a célula e continuar a infectar eritrócitos adicionais.

Nas infecções por *B. caballi*, os glóbulos vermelhos raramente contêm mais do que dois parasitas no seu interior, e a parasitémia no caso destas infecções é invariavelmente baixa – normalmente menos de 0,1% dos eritrócitos encontram-se infectados, inclusivamente em cavalos esplenectomizados (Homer *et al.*, 2000; OIE, 2004; Costa, 2005).

2.3.4.2. Theileria equi

2.3.4.2.1. NO HOSPEDEIRO INVERTEBRADO

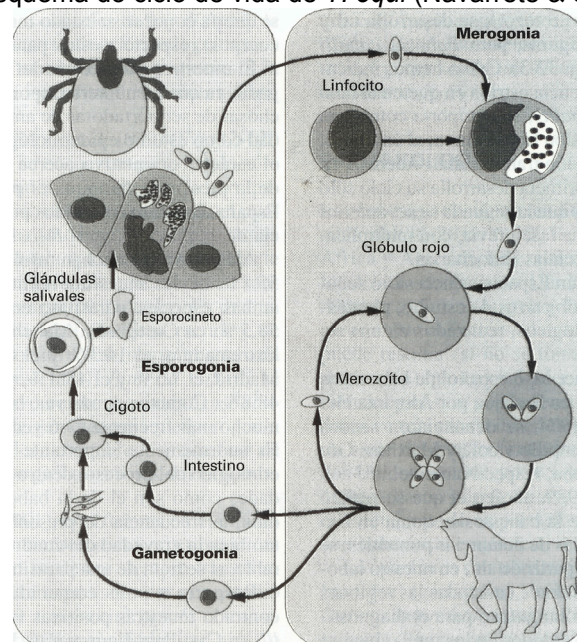
O vector infecta-se ao ingerir eritrócitos do hospedeiro vertebrado contendo merozoítos que, ainda no lúmen intestinal, originam microgâmetas e macrogâmetas. Ao fundirem-se entre si, estes dão origem a zigotos imaturos que evoluem nas células intestinais, donde se irão libertar como ooquinetes para invadir as células acinares das glândulas salivares, iniciando-

se a esporogonia imediatamente após a penetração nestas células originando-se os primeiros esporontes. (Malta, 2001).

Ao oitavo dia, após as larvas ou as ninfas se desprenderem do hospedeiro vertebrado, são encontrados esporontes (formas jovens) nas suas glândulas salivares, que permanecem inalterados até que ocorra a muda do hospedeiro invertebrado para ninfa ou adulto. A maturação dos esporozoítos não se inicia até que a ninfa ou a carraça adulta infectada se fixe ao hospedeiro vertebrado, cinco dias após o qual o processo é completado, com a formação dos esporozoítos infectantes, que serão transmitidos ao hospedeiro vertebrado (De Waal & Van Heerden, 2004).

O desenvolvimento dos esporozoítos, nas células acinares, ocorre de forma assíncrona por todas as glândulas salivares, cada uma das quais apresentando esporoblastos e esporozoítos simultaneamente. Esta característica permite que as carraças, em diferentes estadios de infecção possam infectar mais do que um hospedeiro após a sua transferência (Guimarães, Lima & Ribeiro, 1998). Os esporozoítos de *T. equi* têm aproximadamente 3 a 3,4 µm de comprimento e o seu desenvolvimento nas glândulas salivares da carraça é muito idêntico ao de outras espécies de *Theileria* (De Waal & Van Heerden, 2004).

Figura 7 – Esquema do ciclo de vida de *T. equi* (Navarrete & Serrano, 1999).



T. equi no hospedeiro invertebrado não se comporta como uma verdadeira *babesia*, isto é, com transmissão transovárica. Pelo contrário, *T. equi* apresenta apenas transmissão transestadial, ou seja, um estadio evolutivo da carraça é infectado e a infecção é transmitida ao próximo hospedeiro vertebrado pelo vector no estadio seguinte àquele que se infectou. Assim, a infecção é transmitida ao próximo hospedeiro vertebrado pela ninfa, se foi a larva que se infectou, ou pelo adulto, se foi a ninfa que se infectou (Navarrete & Serrano, 1999). Deste modo, larvas, ninfas e adultos que se alimentem num cavalo infectado, poderão transmitir a infecção a um outro equino (Costa, 2005).

2.3.4.2.2. NO HOSPEDEIRO VERTEBRADO

Theileria equi demonstra que, após a inoculação no equino, através da picada da carraça, os esporozoítos invadem o tecido linfóide e os linfócitos circulantes do hospedeiro vertebrado (OIE, 2004; AVMA, 2006). *T. equi*, em contraste com a espécie *B. caballi*, multiplica-se inicialmente em linfócitos e só mais tarde nos eritrócitos.

Após a inoculação dos esporozoítos pelo vector biológico, os linfócitos são inicialmente invadidos (figura 7). Nestes linfócitos, desenvolvem-se inicialmente esquizontes característicos, na forma de macrosquizontes, que mais tarde se diferenciam em microsquizontes. Os esquizontes de *T. equi* são morfologicamente semelhantes aos de outras espécies do género *Theileria* e podem ser reconhecidos nos linfonodos próximos do local da picada 12 a 14 dias após as carraças se fixarem ao hospedeiro vertebrado. Os microsquizontes contêm um grande número de merozoítos, que depois da destruição da célula hospedeira, são libertados e penetram os eritrócitos.

T. equi, à semelhança de *B. microti*, invade os linfócitos *in vitro* e *in vivo*. Os esporozoítos alojam-se directamente no citoplasma da célula hospedeira, juntando-se para formar um meronte. Os merontes passam por repetidas divisões nucleares mitóticas. A diferenciação dos merozoítos inicia-se, em vários locais, pelo aparecimento de uma dupla membrana sob a membrana celular. O desenvolvimento dos merozoítos de *T. equi* está completo ao nono dia após a sua inoculação (*in vitro*) ou nos 12-15 dias após a fixação das carraças (*in vivo*). Os merozoítos maduros ocupam depois a maioria das células linfáticas, que podem romper-se, libertando-os.

Os merozoítos extracelulares possuem uma membrana simples composta por finas fibrilas que aderem à membrana celular de um eritrócito após contacto, sendo por vezes, encontrados juntos a uma indentação da célula hospedeira (figura 6H). Subsequentemente, os merozoítos entram nos eritrócitos (também designados como micromerozoítos) e parecem estar constritos durante este processo. Imediatamente após a invasão, cada parasita é encontrado no interior de um vacúolo parasitóforo, que desaparece mais tarde na infecção. Durante o crescimento, a membrana que os envolve desaparece e o parasita é libertado no citoplasma da célula hospedeira.

Os trofozoítos de *T. equi* assumem um variedade de formas (oval, redonda, elíptica) e têm um diâmetro superior a 3 µm. Os merozoítos (ou micromerozoítos) aparecem como parasitas piriformes, com cerca de 1,5 µm de comprimento, podendo apresentar-se formando um arranjo conhecido como “cruz de Malta”, formação típica de *T. equi* nos eritrócitos. A rápida reprodução dos merozoítos conduz à destruição da célula eritrocitária conduzindo a uma considerável diminuição do número de eritrócitos, que poderá levar ao aparecimento de hemoglobulinúria em animais infectados por estes agentes (Ali *et al.*, 1996).

2.4. EPIDEMIOLOGIA

Os agentes etiológicos da piroplasmose equina estão disseminados, com prevalências que oscilam entre os 15% e os 100%, por quase toda a Europa, Ásia, África e América, não existindo, ou estando perfeitamente localizada nos Estados Unidos, Austrália, Reino Unido, Alemanha, Suíça, Áustria e Japão. Contudo, em muitos destes locais existe o vector (a carraça) e, por conseguinte, a introdução de animais portadores nestas áreas pode conduzir à propagação epizootica da doença (Navarrete & Serrano, 1999). Caso que se verificou na Florida, em 1961 e 1965, como consequência da importação de cavalos a partir de Cuba, um país com piroplasmose endémica. Após uma campanha agressiva de erradicação e controlo dos vectores biológicos, os Estados Unidos foram novamente considerados livres da doença em 1982, e desde então mantêm regulamentos estritos para que se mantenha com esse estatuto de indemne (Navarrete & Serrano, 1999; AVMA, 2006).

Na Austrália, que é considerado um país livre de piroplasmose equina, *T. equi* foi introduzida por várias ocasiões no seu território. Nas décadas de cinquenta e sessenta, foi introduzida por cavalos importados do Texas, sendo erradicada, seguindo-se um novo surto da doença nos anos setenta devido à importação de cavalos Andaluzes, provenientes de Espanha. Em ambos os casos a doença não se estabeleceu. Embora uma limitada propagação se tenha verificado devido a transmissão iatrogénica, não se registou a ocorrência de transmissão por vectores biológicos. Provavelmente, não se encontram neste país vectores apropriados para o estabelecimento e propagação da doença, estando presentes apenas duas espécies potencialmente vectoras, *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus*, no entanto, a transmissão natural de piroplasmose não foi demonstrada (Martin, 1999).

A distribuição geográfica de *B. caballi* e *T. equi*, sobrepõe-se, em grande parte, à dos seus vectores. Há no entanto regiões que, apesar da presença do vector e do hospedeiro vertebrado, permanecem indemnes, como são o caso da Grã-Bretanha, Suíça, Áustria e Alemanha. Naturalmente, a ameaça de introdução da doença nestas zonas justifica todas as restrições à importação de equídeos impostas internacionalmente (Malta, 2001).

Como vectores transtadias de *B. caballi* e *T. equi*, foram identificadas doze espécies de ixodídeos, dos géneros *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Hyalomma*, oito das quais foram também capazes de transmitir *B. caballi* transovariamente (OIE, 2004). Esta diferença de comportamento entre os dois piroplasmas reveste-se de importância fundamental para a epidemiologia e controlo da doença. Após a infecção com *B. caballi*, os animais podem tornar-se portadores do parasita por mais de quatro anos, enquanto que o estado de portador e a imunidade se mantêm provavelmente para toda a vida, no caso de *T. equi*. Animais portadores do parasita são infectantes para as carraças, podendo as infecções por *B. caballi* persistir por mais de cinco gerações de *Rhipicephalus sanguineus* (De Waal & Van Heerden, 2004). Assim, verifica-se que *B. caballi*, por raramente provocar infecção persistente, garante a sua sobrevivência à custa do hospedeiro invertebrado, constituindo a

população de carraças o seu reservatório, devido à transmissão transovárica que consegue assegurar. A preservação da espécie *T. equi* que no hospedeiro invertebrado não apresenta mais que transmissão transestadial, estaria comprometida sem a infecção persistente que provoca no hospedeiro vertebrado, sendo a população equina considerada como o reservatório de *T. equi* (Malta, 2001; Hinchcliff *et al.*, 2004).

Na Península Ibérica os estudos referentes à presença de ixodídeos são relativamente escassos, mas muitas espécies deste género têm sido assinaladas, infestando designadamente os equinos.

Numa pesquisa levada a cabo por Dias (1994), foram assinaladas na Península Ibérica as seguintes espécies em equinos:

- *Dermacentor marginatus*
- *Haemaphysalis punctata*
- *Rhipicephalus sanguineus*
- *Rhipicephalus bursa*
- *Hyalomma marginatum marginatum*
- *Hyalomma lusitanicum*
- *Boophilus annulatus*
- *Haemaphysalis hispanica* (Malta, 2001).

Destas espécies encontradas, a transmissão das piroplasmoses equinas são atribuídas, principalmente, às espécies *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma marginatum marginatum*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Hyalomma lusitanicum* e *Rhipicephalus bursa* (Navarrete & Serrano, 1999). Segundo o ensaio de Dias (1994) citado anteriormente, todas estas espécies de Ixodídeos estão presentes na região de Setúbal, onde se encontra localizada a Coudelaria da Companhia das Lezírias.

Os levantamentos epidemiológicos realizados em diversas regiões do mundo em que a doença é endémica revelam prevalências muito elevadas. Por exemplo na América Central e do Sul, a seropositividade atinge valores de 94 a 95% na Colômbia, 14 a 29% na Argentina e de 72% no Brasil (Habela, 1993). Na Ásia encontram-se valores de 47 a 96% para a Índia, atingindo os 100% na Arábia Saudita (Habela, 1993). Para Portugal e Espanha os valores reportados oscilam entre 3 e 77% (Habela, 1993).

Na Extremadura espanhola os valores obtidos variam entre 81,4% para *T. equi* e 14,3% para *B. caballi*. No caso do Ribatejo, segundo Serra *et al.* (1993), através do teste de Fixação do Complemento (FC), foram verificados que os valores de prevalência para *T. equi* se situam nos 45,3% e para *B. caballi* nos 15,6%. Num estudo realizado posteriormente por Malta (2001), que avaliou a prevalência de ambos os protozoários numa região alentejana, através do teste de imunofluorescência indirecta de anticorpos (IFI), observou-se uma percentagem de infecção bastante superior aos valores encontrados em ensaios posteriores. Na região de estudo, foi observada uma percentagem de infecção de 65,6%

para *B. caballi*, enquanto que para *T. equi* se verificou uma percentagem de seropositividade de 85,1%. Esta diferença nos valores encontrados em ambas as investigações leva a admitir que a utilização de diferentes técnicas de diagnóstico seja a responsável por tal desigualdade (Malta, 2001).

Poldros nascidos em áreas endémicas normalmente recebem anticorpos maternos contra *T. equi* e *B. caballi*, através do colostro. Como acontece com os vitelos, os poldros encontram-se protegidos de infecções por *Babesia* spp. através de imunidade passiva durante os primeiros seis a nove meses de idade. As infecções que ocorram durante este período, irão causar imunidade sem ocorrência de sinais de desenvolvimento da doença, sendo criada uma situação de estabilidade endémica. Por outro lado, uma situação de instabilidade endémica desenvolve-se quando, devido a exposições pouco frequentes, alguns animais não são infectados por um período considerável (provavelmente mais de 12 meses) após o nascimento, estando depois totalmente susceptíveis.

A transmissão da piroplasmose equina engloba-se em duas categorias: (i) transmissão mecânica, através de instrumentos veterinários contaminados, como agulhas e instrumentos cirúrgicos; (ii) e através de vectores biológicos, as já referidas carraças (Ali *et al.*, 1996; Radostits *et al.*, 2007). Observações de casos clínicos de piroplasmose em neonatos sugerem haver também transmissão transplacentária dos agentes (Roncati, 2006). Phipps e Otter (2004) registaram, o primeiro caso de piroplasmose adquirida congenitamente no Reino Unido, quando um cavalo Lusitano, aí nascido e criado, obteve reacções serológicas positivas nos testes de FC e IFI, durante testes de rotina de certificação para exportação. Segundo os autores, a via de transmissão de *T. equi* mais provável parece ter sido a infecção transplacentária, já que a mãe era uma égua Lusitana, importada de Portugal e, também ela seropositiva para *T. equi*.

Em éguas prenhas, a infecção do feto, em qualquer período da gestação, particularmente com *T. equi*, bem como a falha reprodutiva devido a infecções intra-uterinas, é bastante comum. A infecção normalmente resulta em aborto, com o feto demonstrando lesões características de piroplasmose. Poldros infectados, no entanto, podem nascer, apresentando sinais da doença, ou desenvolvendo esses sinais apenas após alguns dias. Devido à natureza persistente de infecção por *T. equi*, uma égua portadora pode produzir mais de um feto infectado, aleatoriamente, durante a sua vida reprodutiva. Os fetos podem ser infectados por *T. equi* sem desenvolverem a doença, nascendo como portadores do parasita (De Waal & Van Heerden, 2004).

A transmissão transplacentária é apontada como resultante de danos placentários, que permitem a mistura entre sangue materno e fetal, possibilitando a passagem dos parasitas através da placenta. Contudo, os resultados encontrados num estudo levado a cabo por Allsopp, Lewis e Penzhorn (2007), sugerem que a transmissão do parasita surge em gestações com placentação normal, pelo que a hipótese da transferência de parasitas

durante a quebra natural da placenta, que ocorre como resultado de um parto normal, também não pode ser deixada de parte.

É também possível que o mecanismo através do qual ocorre a transmissão do parasita, em gravidezes normais, possa ser específico da fisiologia gestacional do equino. As éguas têm *semiplacenta diffusa incompleta*, e durante o seu desenvolvimento, o embrião equino substitui a nutrição embriónica (utilizando o conteúdo do saco vitelino) pela nutrição histotrófica durante a formação do córion, enquanto os micro-cotiledones são formados, enquanto que a nutrição hemotrófica normal é estabelecida apenas quando a placenta esteja totalmente formada (Allsopp *et al.*, 2007).

Durante a fase histotrófica, que se inicia por volta do dia 40 de gestação e se prolonga até ao dia 150, o embrião é alimentado por uma mistura de secreções das glândulas uterinas, células epiteliais descamadas e eritrócitos maternos. Crê-se que estes eritrócitos maternos garantam uma fonte de ferro para o feto, mas pensa-se, segundo um estudo levado a cabo por Allsopp *et al.* (2007), que também proporcionam uma via directa para a passagem de organismos de *T. equi*, através da placenta em desenvolvimento, para infectar o feto. Este estudo indica também que o feto não produz anticorpos anti-*T. equi in utero*, apesar da presença do parasita no sangue. Como os anticorpos maternos não atravessam a placenta epiteliocorial equina, o sangue dos poldros só se torna positivo para anticorpos anti-*T. equi* após a ingestão de colostro. Estes anticorpos colostrais, que persistem por 4 meses após o nascimento, não eliminam a infecção por *T. equi*, contudo sugerem actuar no controlo do nível da parasitémia, juntamente com respostas imunitárias inatas, permitindo o desenvolvimento de um estado endémico estável entre o parasita e o hospedeiro.

O facto de *T. equi* ser detectado em fetos com menos de 4 meses de gestação, indica que a transmissão transplacentária ocorre anteriormente ao suficiente desenvolvimento do sistema imunitário, que permita o reconhecimento de moléculas como estranhas. Assim sendo, os parasitas, já presentes no organismo, serão reconhecidos como “self” pelo neonato. Diferenças antigénicas nos parasitas transmitidos pela subsequente infecção natural, irá induzir, então, uma resposta imunitária em animais infectados congenitamente (Allsopp *et al.*, 2007).

Devido à natureza endémica em diferentes partes do mundo (sul dos EUA incluído), a transmissão hemospérmica da piroplasmose, tem recebido atenção especial, sobretudo devido ao crescente aumento da transferência de equinos entre países. Situações de hemospermia (presença de sangue no sémen), embora poucas vezes diagnosticadas em garanhões, frequentemente acontecem, sobretudo, devido a defeitos uretrais, podendo também desenvolver-se devido a outras condições patológicas do tracto urogenital.

A quantidade da contaminação sanguínea do sémen pode variar de uma hemospermia franca e avermelhada a uma contaminação mínima que é apenas diagnosticada através do exame microscópico do ejaculado. Independentemente da etiologia ou grau de

contaminação, o sangue tem o potencial de difundir doenças transmissíveis, particularmente de vírus e protozoários. A piroplasmose é transmitida normalmente por carrapatos, no entanto, situações de transmissão mecânica foram também documentadas, e por este motivo, surge preocupação relativamente à transmissão venérea da doença se o sangue de um animal infectado contaminar o sémen (Metcalf, 2001).

2.4.1. FACTORES DE RISCO

2.4.1.1. RELATIVOS AO HOSPEDEIRO VERTEBRADO

Encontra-se descrito que há uma relação inversa entre idade e resistência a infecções por *Babesia* spp., na qual jovens animais são menos susceptíveis do que os mais velhos. A razão para que esta situação ocorra não é, no entanto, conhecida.

As reagudizações de situações crónicas ocorrem principalmente em animais mantidos sob regime de estabulação, raramente atingindo animais criados a campo (Allsopp *et al.*, 2007). Nas áreas endémicas, o retorno à fase aguda de animais que apresentam infecção latente, particularmente entre os animais adultos, está normalmente associada com alguma forma de “stress”, tais como o parto, esforço físico, por restrições alimentares ou presença de uma outra doença, bem como quando sujeitos a imunossupressão por fármacos (corticoesteróides) ou por processo patológico imunossupressor (Urquhart *et al.*, 1996; Nogueira *et al.*, 2005).

Hailat *et al.* (1997) num estudo realizado numa coudelaria de cavalos de corrida na Jordânia, relataram, dentro de um grupo de 47 equinos que foram expostos a exercício físico vigoroso, a morte de duas éguas, bem como a súbita relutância ao movimento e imobilidade de outras três. Todos estes cinco animais apresentavam sinais de piroplasmose equina, incluindo icterícia grave e hemoglobinúria, encontrando-se bastante parasitados por *T. equi*. Com estas observações concluíram que o elevado esforço físico pode predispor os equinos a manifestar clinicamente a doença (Hailat *et al.*, 1997).

Bezerros e poldros provenientes de mães infectadas recebem anticorpos pela via colostrar, tendo sido demonstrado que os anticorpos anti-*Theileria* e anti-*Babesia*, adquiridos passivamente, decaem para níveis indetectáveis aos 4 ou 5 meses de idade (Navarrete & Serrano, 1999; Phipps & Otter, 2004; Allsopp *et al.*, 2007). Por outro lado, poldros e bezerros nascidos de mães susceptíveis são altamente sensíveis à infecção e passíveis de desenvolver doença clínica desde o nascimento até aos dois meses de idade quando, então, desenvolvem imunidade inata que persiste até cerca de seis meses (Navarrete & Serrano, 1999).

2.4.1.2. FACTORES AMBIENTAIS

A ocorrência de piroplasmose equina coincide com a actividade sazonal dos estadios adultos das carraças, e por conseguinte os casos clínicos são encontrados mais frequentemente durante os meses de Verão. Ambos os parasitas partilham frequentemente os mesmos vectores numa dada região, estando por isso intimamente associados, embora *T. equi* esteja mais largamente distribuída que *B. caballi* (De Waal & Van Heerden, 2004).

Dos factores climáticos, a temperatura é o mais importante, em virtude do seu efeito sobre a actividade das carraças (temperaturas mais altas aumentam essa actividade). A humidade e a precipitação afectam pouco, e mesmo a temperatura tem efeito limitado, uma vez ultrapassado o limiar mínimo de 7°C-10°C (Radostits *et al.*, 2007). Os habitats preferidos para as carraças são constituídos por erva e arbustos, com humidade suficiente, para que os seus ovos se consigam desenvolver antes que ocorra a dessecação, sendo a interface entre a floresta e o prado ocupada por diversos géneros.

Geralmente, as carraças são mais favorecidas por terrenos relvados e arborizados, do que sobre terrenos cobertos de sujidades ou arenosos. Sendo assim, o risco de doenças transmitidas por carraças é diminuído, embora não impossível, em instalações urbanas (Hinchcliff, Kaneps & Geor, 2004).

Nas estações em que ocorre uma diminuição na população de carraças, a infecção pode desaparecer, havendo uma perda de imunidade. Assim, nas estações favoráveis, em que ocorre multiplicação de carraças, a infecção propaga-se rapidamente na população que se tornou susceptível. Situações semelhantes podem ser criadas, ao serem instituídos programas ineficientes de banhos carracidas, capazes de reduzir a população de carraças a níveis baixos, mas incapazes de mantê-la sob controlo (Radostits *et al.*, 2007).

2.5. IMUNIDADE E SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO

A imunidade na babesiose é complexa, parecendo haver uma fraca relação entre o grau de imunidade e o nível de anticorpos séricos. Nas infecções naturais pela maioria das espécies de *Babesia* é desenvolvida uma sólida imunidade e caso ocorram reinfecções seguidas, a imunidade tornar-se-á permanente. Se a terapêutica instituída nos casos de piroplasmose for rápida e eficiente, e caso ocorra a destruição dos organismos protozoários anteriormente à produção de anticorpos, não há desenvolvimento de imunidade por parte do animal.

Contudo, apesar da potencial gravidade da infecção aguda, os indivíduos que sobrevivem, por norma, desenvolvem imunidade contra a doença, mas não contra a infecção, podendo permanecer persistentemente infectados. Contribuem para esta boa adaptação das infecções por *Babesia* spp. à sobrevivência em hospedeiros imunes, fenómenos como a rápida variação antigénica e o estabelecimento de uma imunossupressão transitória (Radostits *et al.*, 2007).

Em áreas endémicas, os animais jovens inicialmente adquirem imunidade passivamente, através do colostro da égua e, como resultado, normalmente sofrem apenas infecções transitórias com ligeiros sinais clínicos. No entanto, estas infecções são aparentemente suficientes para estimular a imunidade activa, sendo a sua recuperação seguida por longos períodos, durante os quais permanecem portadores, mantendo-se o seu sangue infectante para as carraças por vários meses.

Nestas zonas endémicas, onde estão presentes várias carraças infectadas, a imunidade do hospedeiro é mantida em níveis elevados, pela repetida exposição a estes vectores e a ocorrência de doença é rara. Pelo contrário, onde existe uma reduzida população de carraças ou quando se encontram em áreas limitadas, a imunidade da população é baixa e os animais jovens recebem pouca, se alguma, protecção colostrá. Nestas situações, se o número de carraças aumentar de repente, devido, por exemplo, a condições climáticas favoráveis, a incidência de casos clínicos pode aumentar bruscamente. Esta situação é conhecida como instabilidade enzoótica (Urquhart *et al.*, 1996).

Os organismos eucariotas (parasitas, *stricto sensu*) são biologicamente mais complicados que os procariotas (bactérias e vírus), o que complica consideravelmente o estudo e interpretação da sua imunologia. Muitos parasitas, por exemplo, apresentam diversos estádios que produzem antigénios únicos, libertados a diferentes concentrações, em vários tecidos do hospedeiro.

A imunidade à infecção por *Babesia* geralmente depende da resistência inata do hospedeiro e da resposta específica aos antigénios com origem nas formas de *Babesia* spp.. Os macrófagos activados e os seus produtos solúveis (monoquinas) são eficazes na estimulação da imunidade para a babesiose. Os mecanismos imunológicos específicos, incluem ambos os componentes humoral e celular. Anticorpos induzidos primariamente, como resultado da actividade de linfócitos T-helper, neutralizam a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos e exaltam a fagocitose de parasitas livres e de células infectadas. Há uma forte evidência de que a recuperação de infecções por *Babesia* é linfócitos T dependente, com as células natural-killer desempenhando um papel na protecção. Muita da resposta humoral para ambas *Babesia* e *Plasmodium* spp. é direccionada para os antigénios do estadio assexuado sanguíneo, particularmente para o do merozoíto.

No decurso das infecções por *B. caballi* ou *T. equi*, os cavalos desenvolvem uma imunidade que os protege de reinfeções. Após recuperarem da infecção aguda, os cavalos permanecem portadores do parasita por um longo período de tempo. Os animais desenvolvem um estado imunitário, do tipo “imunidade à infecção”.

Pensa-se que a imunidade a *T. equi*, envolva, pelo menos parcialmente, mecanismos imunitários mediados celularmente. Segundo trabalhos realizados por Zweygarth, Ahmed e Rehbein (1983) e Banerjee *et al.* (1977) é possível que a imunidade apenas seja adquirida após a invasão de células imunocompetentes por esquizontes de *T. equi*.

Não existe imunidade cruzada entre *B. caballi* e *T. equi*. Adicionalmente aos mecanismos imunitários de defesa celular, há uma resposta humoral activada por infecções de *B. caballi*. Em áreas enzoóticas, as superinfecções constantes induzem uma imunidade estável. Os poldros, de éguas inaparentemente infectadas, encontram-se já infectados no primeiro ano após o nascimento, e sob a protecção de anticorpos maternos, normalmente passam por infecção inaparente. Casos clínicos são assim raros em regiões enzoóticas (estabilidade enzoótica). Uma diminuição nas defesas imunitárias e um novo recrudescimento da infecção apenas ocorre em situações extremamente indutoras de “stress”. (Ali *et al.*, 1996).

Os cavalos que sobrevivem à infecção inicial estão protegidos de doença clínica até à subsequente reinfeção, sendo sugerida a hipótese, que a resistência à doença clínica adquirida por equinos, após a infecção por *T. equi*, seja resultado da estimulação contínua da imunidade, pela permanência do parasita.

Anticorpos direccionados contra a proteínas de superfície, da fase eritrocítica, podem ser promotores importantes na imunidade às infecções por hemoprotozoários, tendo sido encontrados em hospedeiros infectados, demonstrando imunidade à doença clínica.

O baço desempenha um papel determinante na imunidade de infecções hemoprotozoárias. A respeito de infecções por *T. equi*, cavalos com baço intacto normalmente controlam a infecção e sobrevivem. Por outro lado, cavalos esplenectomizados, usualmente sucumbem à infecção e apresentam parasitémias superiores a 40% (Knowles, Kappmeyer & Perryman, 1994).

Poldros com Imunodeficiência Combinada Grave (SCID), apresentam um defeito nas “stem-cells” que impede a maturação de linfócitos B e T, resultando numa completa incapacidade de produzir respostas imunitárias específicas para antígenos (Zaugg, 2002). No entanto, poldros SCID possuem complemento, macrófagos, granulócitos, células “natural-killer”, bem como o baço intacto. Os poldros afectados por esta condição hereditária são, portanto, seleccionados para a avaliação do papel das respostas imunitárias na patogenia e controlo da doença causada por *T. equi*. Permite também a avaliação do papel dos macrófagos esplénicos no controlo da parasitémia por *T. equi*, independente da imunidade específica.

O estudo realizado por Knowles *et al.* (1994), sobre as respostas específicas imunitárias necessárias para o controlo da parasitémia nas infecções por *T. equi*, utilizando poldros SCID, evidenciou que o controlo de infecções por *T. equi* requer respostas imunitárias específicas. Observou-se neste estudo que as respostas imunitárias parasito-específicas não são necessárias para que ocorra eritrólise, associada a infecções por *T. equi*. Demonstrou-se também que o baço era incapaz de controlar a infecção por *T. equi*, na ausência de respostas parasito-específicas, bem como que para o controlo de infecções por *T. equi*, em poldros SCID, respostas imunitárias específicas são indispensáveis pois, apesar de existir eritrofagocitose, de eritrócitos infectados, por macrófagos, este mecanismo não foi capaz de controlar a infecção por *T. equi*.

2.6. PATOGENIA

A maioria dos casos clínicos são causados pela espécie *T. equi*, enquanto que as infecções por *B. caballi* tendem a ser clinicamente inaparentes e raramente são responsáveis por anemia grave ou outros sinais típicos de babesiose (Ali *et al.*, 1996).

Os sinais clínicos observados são resultado da destruição de eritrócitos, da activação do complemento e da libertação de mediadores inflamatórios (bradiquinina, histamina e 5-hidroxitriptamina). A gravidade dos sintomas reflecte o número de células destruídas e o grau de activação das cascatas inflamatórias e do complemento (AVMA, 2006). Um ensaio levado a cabo por Hanafusa *et al.* (1998), sugeriu que em animais infectados por *B. caballi*, o monóxido de azoto (NO) e o factor de necrose tumoral α (TNF- α) bem como outras citocinas, podem fornecer respostas imunitárias suplementares contra o parasita, se produzidas em quantidades óptimas. Contudo, em quantidades excessivas estas moléculas podem contribuir para a patogénese da doença (Hanafusa *et al.*, 1998).

A hemoglobina libertada, se em grande quantidade, e caso seja transformada em metahemoglobina, dará origem a hemoglobinúria com urina de cor vermelha ou castanha, ou a icterícia se transformada em bilirrubina (Malta, 2001). A sintomatologia clínica é usualmente inespecífica e a doença pode ser facilmente confundida com outras condições (OIE, 2004).

O período de incubação de *T. equi*, após a infestação por carraças, varia de 12 a 19 dias, ao passo que, no caso de infecção por *B. caballi* o período varia de 10 a 30 dias (AVMA, 2006). A infecção é seguida de parasitémia, que nos casos agudos de *B. caballi* variam de 0,1% até 10% dos eritrócitos, ao passo que em infecções por *T. equi*, a parasitémia pode ultrapassar 20% dos glóbulos vermelhos, embora sejam mais comuns níveis entre 1 e 5%. Este facto torna muito difícil a demonstração de *B. caballi* em esfregaços sanguíneos. No entanto, pelo facto de *T. equi* se encontrar mais proximamente relacionada com outras espécies do género *Theileria* do que com as espécies de *Babesia*, não é de estranhar que o piroplasma seja encontrado em esfregaços sanguíneos por longos períodos, uma característica de espécies benignas de *Theileria*, tais como *T. mutans* e *T. orientalis* (Ali *et al.*, 1996). As diferenças nos períodos de incubação e nos níveis de parasitémia, que ocorrem no sangue durante o desenvolvimento da doença, são determinados, em parte, pelas diferenças entre as várias espécies de *Babesia* que causam a infecção (Ali *et al.*, 1996).

Existem espécies, como a *B. bovis*, que provocam a adesão ao endotélio vascular dos eritrócitos afectados, originando doença com uma parasitémia inferior à daquelas que não possuem esta característica. Os eritrócitos infectados com *B. bovis*, aderem ao interior dos capilares, impedindo a circulação sanguínea para órgãos como os rins e o cérebro, que devido à anóxia acabam por sofrer danos. Reacções alérgicas devido a libertações de antígenos no local da concentração parasitária, podem também contribuir para a doença.

B. caballi, bem como *B. bigemina* e *B. canis*, não causam adesão dos eritrócitos afectados ao endotélio vascular e, sendo assim, não se concentram nos capilares, o que levaria ao seu bloqueio, nem libertam antígenos. Estas espécies causam doença apenas quando se verifica elevada parasitémia.

Os parasitas *B. bovis*, promovem também a libertação de quininas e outras substâncias vasoactivas, que podem provocar vasodilatação, colapso circulatório, coma e morte, condição que é denominada, por vezes, de babesiose cerebral. Esta situação ocorre não apenas em bovinos infectados por *B. bovis*, mas também em cães infectados por *B. canis* e cavalos infectados por *B. caballi* (Ali *et al.*, 1996). O desenvolvimento, nalguns casos, de laminite associada a estase gastrointestinal, pode ser consequência da absorção de endotoxinas (De Waal & Van Heerden, 2004).

Infecções por *B. caballi* são geralmente menos graves, visto que um menor número de eritrócitos são infectados e destruídos. No entanto, nas infecções por *T. equi* que originam a destruição de mais de 20% dos eritrócitos do hospedeiro, resulta uma situação mais séria, que pode conduzir à morte dos animais infectados após 24 a 48 horas do início dos sinais clínicos (AVMA, 2006).

Em animais portadores de *B. caballi*, a infecção pode persistir por 1 a 4 anos verificando-se, de facto, um declínio na produção de anticorpos, sendo a eliminação espontânea do parasita feita num intervalo médio de três a quinze meses (Pereira *et al.*, 2004).

Equinos infectados com *T. equi*, por seu turno, tornam-se portadores para toda a vida deste agente de piroplasmose e o desaparecimento espontâneo destes organismos parece não ocorrer (AVMA, 2006). Uma vez superada a infecção pelo hospedeiro, este desenvolve uma imunidade que o protege contra futuras infecções, convertendo-se num portador latente ou inaparente. A seroprevalência nestes hospedeiros permanece durante anos e segundo alguns autores, por toda a vida. Este estado de equilíbrio pode desaparecer como consequência de uma situação indutora de “stress”, de tratamentos com efeitos immunosdepressores, esforço físico, restrição alimentar ou pelo desenvolvimento de um processo patológico immunodepressor concomitante (Navarrete & Serrano, 1999; Nogueira *et al.*, 2005).

O desenvolvimento progressivo de anemia é típico de infecções por *T. equi*. Os picos de parasitémia são acompanhados por diversos graus de trombocitopénia, hipofosfatémia, hipossiderémia, bem como bilirrubinémia. Embora, a patogénese da anemia não esteja completamente elucidada, a hipofosfatémia pode desempenhar um papel importante. Os parasitas do género *Babesia* dependem dos eritrócitos para o seu fornecimento de energia e o aumento de utilização de fósforo por parte dos glóbulos vermelhos pode ser o responsável pelo desenvolvimento de um estado hipofosfatémico. Esta situação pode contribuir para a maior fragilidade dos eritrócitos parasitados.

Em casos de piroplasmose equina complicada por outras infecções, como peste equina africana ou infestações por helmintes, pode desenvolver-se Coagulação Intravascular Disseminada (CID). Contudo, piroplasmose complicada por outras situações não foi associada ao desenvolvimento de CID (De Waal & Van Heerden, 2004).

A infecção intrauterina do feto é uma complicação séria das infecções por *T. equi*, e as perdas a ela associadas parecem ser relativamente comuns. Os animais infectados tornam-se portadores, provavelmente para toda a vida, e uma potencial infecção intrauterina pode ocorrer durante todo o período reprodutivo da égua (Ali *et al.*, 1996), provavelmente pela passagem de eritrócitos parasitados através da barreira placentária (Portz *et al.*, 2007).

Enquanto a parasitemia em adultos que morrem da doença é normalmente baixa, nos fetos abortados e em poldros neonatos esta pode ser superior a 50% (De Waal & Van Heerden, 2004). Embora infecções intrauterinas por *B. caballi* tenham sido registadas, raramente ocorrem (Ali *et al.*, 1996).

2.7. SINTOMATOLOGIA E PATOLOGIA CLÍNICA

A piroplasmose equina, também denominada como febre biliar, é uma afecção que pode ocorrer sob a forma aguda, sub-aguda ou crónica em membros da família Equidae (Ali *et al.*, 1996). Uma forma hiperaguda, rara, em que os animais são já encontrados mortos ou moribundos, foi também descrita (De Waal & Van Heerden, 2004).

A piroplasmose manifesta-se por sinais clínicos, na sua maioria, inespecíficos e bastante variáveis de caso para caso. Os cavalos afectados podem apresentar anorexia, abatimento, uma perda de peso, temperatura corporal aumentada ou normal ou um aumento nas frequências cardíaca e respiratória. A presença de uma forte hipertermia, eventualmente acompanhada de abatimento ou anorexia, constitui normalmente o único sintoma evocativo de uma piroplasmose equina. A coloração das mucosas é variável, podendo apresentar-se rosa pálido, amarelo pálido, francamente amarelas ou congestivas, com estas últimas a poderem exibir petéquias (Amory & Pitel, 2007).

A queda de performance apresenta-se como a principal queixa associada à babesiose equina, especialmente, quando se tratam de animais de competição (Botteon *et al.*, 2005). A explicação para a diminuição do potencial atlético dos animais baseia-se, sobretudo, no facto dos portadores crónicos da doença apresentarem anemia, ainda que muito discreta, e quando ocorrem reagudizações periódicas da doença, os animais podem ser levados a fracassos inesperados (Nogueira *et al.*, 2005). A taxa de mortalidade da doença, depende do estado imunitário geral do hospedeiro afectado, bem como da virulência da espécie de piroplasma (Rüegg *et al.*, 2002).

As infecções por *B. caballi* são normalmente clinicamente inaparentes e, apenas raramente, responsáveis por anemia grave ou outros sinais típicos de piroplasmose, sendo *T. equi* a responsável pela maioria dos casos clínicos associados a piroplasmose equina.

Os casos agudos são os mais comuns, e são caracterizados por hipertermia, normalmente superior a 40°C, apetite reduzido, inapetência, anemia hemolítica, taquipneia e taquicardia, relacionadas com a redução do número de eritrócitos circulantes e com a consequente limitação na capacidade de transporte de oxigénio pelo sangue (AVMA, 2006). A febre é normalmente acompanhada de sudação, congestão das membranas mucosas e taquicardia. As fezes apresentam-se usualmente menores e mais secas que o normal, com uma coloração verde-amarelada (De Waal & Van Heerden, 2004).

Podem também ser observados outros sintomas, tais como, edemas palpebrais, lacrimejar, hemorragias, problemas de locomoção (sobretudo paralisia dos membros posteriores) e esplenomegália, pois o baço, como órgão envolvido primariamente na remoção dos eritrócitos afectados da corrente sanguínea, poderá encontrar-se aumentado (Navarrete & Serrano, 1999; AVMA, 2006).

Os casos sub-agudos demonstram graus variáveis de anorexia e icterícia, perda de peso, temperatura rectal elevada ou normal e frequências respiratória e cardíaca elevadas. Frequências cardíacas superiores a 60 batimentos por minuto podem ser acompanhadas por murmúrios sistólicos de grau médio. A febre é normalmente mais intermitente em infecções por *T. equi* do que por *B. caballi* (De Waal & Van Heerden, 2004).

As membranas mucosas podem apresentar petéquias ou equimoses variando a sua coloração de rosa pálido a rosa, ou de amarelo pálido a amarelo vivo. Icterícia e hemoglobinúria desenvolvem-se devido à libertação de hemoglobina livre como consequência da eritrólise dos eritrócitos afectados. Se quantidades suficientes de hemoglobina livre se encontrarem presentes na corrente sanguínea ou se um número suficiente de eritrócitos se acumularem, podem provocar danos renais e resultar, consequentemente, em insuficiência renal. Os movimentos intestinais normais podem apresentar-se ligeiramente diminuídos e os animais podem apresentar sinais de cólica ligeira, associada a situações de impactação, que alternam com diarreia. As fezes são pequenas e de consistência mais firme que o normal, sendo revestidas por uma fina camada de muco. A urina é normalmente amarela-escura ou alaranjada, ou mesmo castanha, mas nalguns casos apresenta-se castanho-avermelhada como resultado dos pigmentos de hemoglobina e biliar. O exame por palpação rectal revela usualmente o baço aumentado (De Waal & Van Heerden, 2004). Uma ligeira tumefacção edematosa das porções distais dos membros por vezes ocorre, como resultado da saída de fluido dos tecidos (AVMA, 2006).

Casos negligenciados, ou não tratados, tornam-se gravemente anémicos e apresentam sinais de mau estado geral, tais como pescoço e cabeça pendentes, tropeçar, balancear, tremores musculares e decúbito. Pode ocorrer um ligeiro inchaço edematoso das porções distais dos membros bem como marcado edema prepucial. Foram também relatadas situações de edema da cabeça, membros e abdómen.

A ocorrência de peste equina africana e infestações por helmintes concorrentemente com piroplasmose, pode explicar sinais clínicos atípicos, tais como edema das fossas supraorbitais e edema do abdómen e tórax, por vezes associados com a doença (OIE, 2004; De Waal & Van Heerden, 2004).

Num recente caso, apresentado por Diana *et al.* (2006), um equino para além de apresentar sinais clínicos indicativos de piroplasmose sub-aguda, exibia também a existência de complexos supraventriculares e juncionais prematuros e taquicardia associados a uma elevação sérica de troponina cardíaca I (cTnI) e da fracção MB da creatina fosfoquinase (CK-MB). As troponinas cardíacas são consideradas biomarcadores sensíveis de lesão miocárdica em mamíferos. A terapia específica e de suporte para piroplasmose foi instituída, permitindo a remissão dos sinais clínicos e do perfil laboratorial anormal, incluindo os parâmetros relacionados com o envolvimento do miocárdio. Embora diversas lesões cardíacas tenham sido associadas à babesiose equina, conclui-se assim que também as arritmias cardíacas podem fazer parte das complicações associadas à doença, como foi já demonstrado noutras espécies (Diana *et al.*, 2006).

Apesar da gravidade da forma aguda, a maioria dos animais desenvolve a forma crónica da doença, podendo apresentar reagudizações em circunstâncias que determinem uma diminuição na taxa de anticorpos, como situações associadas a “stress”. Esta condição, caracterizada por sinais clínicos inespecíficos, provoca prejuízos directos, representados principalmente pela queda de performance dos animais, inapetência moderada e perda de peso, para além da predisposição para outros processos concomitantes (Navarrete & Serrano, 1999; AVMA, 2006; Allsopp *et al.*, 2007). Alguns casos revelam membranas mucosas rosa-pálidas e taquicardia moderada. O baço encontra-se usualmente aumentado (De Waal & Van Heerden, 2004). Sinais como esplenomegália e estado febril transitório poderão também estar presentes nestes portadores crónicos (Navarrete & Serrano, 1999; AVMA, 2006; Allsopp *et al.*, 2007).

A infecção de *T. equi* em éguas prenhas é citada como a causa mais comum de aborto em equinos (De Waal *et al.*, 1992). Fetos abortados apresentam lesões características de piroplasmose equina e assume-se que, uma vez que o parasita atravesse a placenta e infecte o feto, o resultado será o aborto ou o nascimento de um poldro com babesiose neonatal (Allsopp *et al.*, 2007). A piroplasmose neonatal em poldros é caracterizada por fraqueza à nascença ou pelo rápido estabelecimento de apatia e desenvolvimento de anemia, elevado grau de icterícia e mau estado geral, normalmente após a ingestão do colostro. Os poldros afectados tornam-se progressivamente letárgicos e por fim incapazes de se manter em estação ou de mamar. Apresentam, regularmente, febre e podem evidenciar a presença de petéquias nas membranas mucosas. Contudo, alguns poldros apresentam-se aparentemente normais à nascença, desenvolvendo sinais da doença apenas dois ou três dias depois.

Sinais neurológicos são raramente observados em animais com piroplasmose. Ataxia marcada, tremores generalizados e espasmos clónicos suaves a moderados têm sido descritos em jovens poldros, associados a temperaturas rectais elevadas e esfregaços sanguíneos positivos para *T. equi*.

Uma variedade de complicações têm sido relatadas na piroplasmose equina, sendo a insuficiência renal aguda uma delas, provocando elevações marcadas nas concentrações de ureia e creatinina séricas. Alguns animais podem apresentar-se com sinais de cólica e enterite, sendo o prognóstico mau quando estas situações ocorrem juntamente com laminite.

Em garanhões, a perda completa ou parcial de fertilidade, temporária ou permanentemente tem sido relatada. As éguas podem abortar em qualquer estágio da gestação como resultado de doença sistémica e pirexia, mas normalmente não há história de doença anterior, em éguas que abortam. Os abortos ocorrem mais comumente nos últimos três meses de gestação, após a infecção intra-uterina, sendo normalmente acompanhados pela expulsão simultânea da placenta. A involução uterina é normal e a subsequente concepção não é afectada (De Waal & Van Heerden, 2004).

Reduções na concentração de hemoglobina, nas contagens de glóbulos vermelhos e de plaquetas são típicas das infecções por *T. equi* e *B. caballi*, sendo as infecções agudas caracterizadas por linfopenia e neutropenia. Quedas significativas nas concentrações de fibrinogénio plasmático, bem como concentrações elevadas de bilirrubina têm sido descritas. Estão também presentes vários graus de hemoglobinúria e baixas concentrações de fósforo e ferro plasmáticos. Anemia grave, com contagens eritrocitárias tão baixas como 2 milhões/ μ l e níveis de hemoglobina inferiores a 3 g/dl ocorrem em casos clínicos, de cavalos e bovinos, verificando-se o pico de anemia entre os 9 a 16 dias após a infecção. Os cavalos que sofrem de nefrose hemoglobinúrica apresentam concentrações séricas de sódio e cloro diminuídas e de ureia e creatinina aumentadas. Verifica-se também uma diminuição na gravidade específica da urina (De Waal & Van Heerden, 2004; Radostits *et al.*, 2007). Por vezes, verifica-se um aumento sérico da actividade das enzimas hepáticas (ALT, AST, GGT e fosfatase alcalina) e da creatina fosfoquinase (CK). Após alguns dias pode-se notar monocitose (Amory & Pitel, 2007).

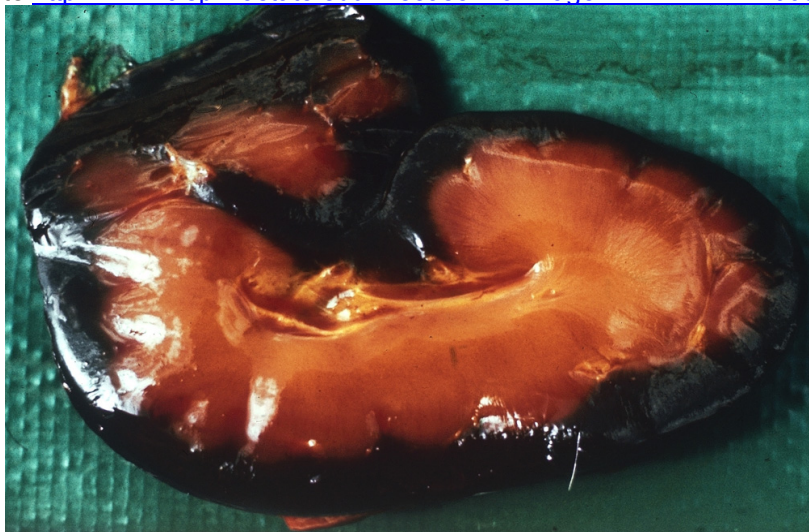
2.8. LESÕES POST-MORTEM

As características macroscópicas post-mortem da piroplasmose equina incluem palidez e icterícia generalizadas (ainda mais proeminentes do que o observado no caso dos bovinos), edema subcutâneo e subseroso, emaciação, hepatomegalia, renomegalia e esplenomegalia, ascite, hidrotórax, efusão pericárdica, edema pulmonar e linfadenopatia (Hinchcliff *et al.*, 2004).

Achados patológicos incluem: anemia e icterícia; edema de tecidos subcutâneos e subserosos; vários graus de icterícia; hepatomegália (fígado encontra-se distendido e as veias hepáticas contêm grandes coágulos amarelados) e esplenomegália (baço está alargado, com os bordos arredondados); rins pálidos ou vermelho-acastanhados (figura 8) e aumentados de volume com hemorragias subcapsulares e corticais, em casos hemoglobinúricos.

Figura 8 – Rim de equino.

(Fonte: http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/ImageDB/EPR/EPR_003.jpg).



Córtex renal vermelho escuro devido à hemoglobinúria. Medula e pélvis renal exibindo icterícia.

Encontram-se também presentes ascite, hidrotórax e hidropericárdio, com hemorragias epicardiais e endocardiais, para além de congestão, edema pulmonar e sinais de pneumonia, bem como aumento do tamanho dos linfonodos (Zaugg, 2002; CFSPH, 2003; De Waal & Van Heerden, 2004).

Fetos abortados relativamente cedo na gestação encontram-se, por norma, bastante autolisados. As lesões em fetos abortados e neonatos incluem anemia, icterícia moderada a grave, petéquias nas superfícies visceral e serosas, hidrotórax, congestão e edema pulmonar, esplenomegália e hepatomegália (figuras 9 e 10). A placenta apresenta-se normalmente edematosa e contendo pequenas hemorragias dispersas ou grandes manchas hemorrágicas. A maioria dos eritrócitos presentes na placenta encontram-se parasitados (De Waal & Van Heerden, 2004).

Em casos agudos de babesiose, em todas as espécies, nos quais os pacientes morrem após um breve período de doença, e durante uma crise anémica, as lesões típicas são a icterícia, tecidos pálidos, esplenomegália (apresentando-se o fígado com consistência suave e polposa), aumento significativo e coloração castanha escura do fígado. Os rins apresentam-se aumentados e escuros, e a bexiga contém urina vermelha escura. Estão presentes hemorragias equimóticas sob o epicárdio e o endocárdio, contendo o saco

pericárdico uma quantidade significativa de líquido sanguinolento. Uma lesão característica em cavalos e bovinos é uma grave coagulação intravascular.

Figura 9 – Feto abortado evidenciando grave icterícia (De Waal & Van Heerden, 2004).



Figura 10 – Hepatomegália, esplenomegália e grau elevado de icterícia em feto abortado (De Waal & Van Heerden, 2004).



Em casos subagudos ou crônicos de longa duração, a carcaça apresenta-se emaciada mas a hemoglobinúria está ausente, enquanto que as restantes alterações observadas nos casos agudos estão presentes, mas menos pronunciadas (Radostits *et al.*, 2007).

Achados histopatológicos incluem congestão e edema dos pulmões e alterações gordas e estase biliar no fígado. A nefrose é caracterizada pela degenerescência hidrópica e gorda do epitélio tubular, e por moldes de proteína e hemoglobina em vários túbulos no córtex e medula. Congestão, hemossiderose e depleção de linfócitos são observados no baço (De Waal & Van Heerden, 2004).

Observa-se também proliferação de células reticuloendoteliais no fígado, rins, pulmões e linfonodos (Hinchcliff *et al.*, 2004). Destacam-se fenómenos de eritrofagocitose, hemorragias

generalizadas, icterícia, edema (tanto subcutâneo como pulmonar), processos degenerativos nos linfonodos, fígado e pulmões (Navarrete & Serrano, 1999).

2.9. DIAGNÓSTICO

Clinicamente, uma elevada morbilidade, em casos exibindo icterícia com hemoglobinúria e febre são sugestivos de piroplasmose, sendo, no entanto, essencial para a confirmação do diagnóstico a análise de esfregaços sanguíneos ou a realização de exames laboratoriais, devendo ser verificada a presença do vector biológico (Radostits *et al.*, 2007).

Sinais clínicos, observação de esfregaços sanguíneos, serologia, inoculação de sangue infectado em animais susceptíveis e xenodiagnóstico são úteis no diagnóstico de piroplasmose equina, sendo, contudo, impossível a diferenciação da doença causada por *T. equi* e *B. caballi*, tendo por base apenas os sinais clínicos.

Um diagnóstico correcto do parasita específico envolvido na piroplasmose equina é essencial devido à diferença de sensibilidade a fármacos existente entre ambos os parasitas, podendo contudo ocorrer frequentemente infecções mistas de *B. caballi* e *T. equi* (De Waal & Van Heerden, 2004).

Animais já infectados podem ser identificados demonstrando os parasitas através de esfregaços sanguíneos corados pelos métodos de Romanovsky, tais como o método Giemsa, que normalmente apresenta melhores resultados (OIE, 2004).

A detecção directa de parasitas durante a fase aguda da infecção pode ser alcançada através da observação de esfregaços sanguíneos, sendo a presença de dois grandes parasitas intraeritrocitários formando um ângulo agudo entre si, indicativo de infecção por *B. caballi*. A infecção por *T. equi* é tipicamente caracterizada pela presença intraeritrocitária de quatro pequenos merozoítos arrançados na forma da denominada “cruz de Malta” (Hinchcliff *et al.*, 2004). Num estudo realizado por Mahoney *et al.* (1977), as formas dos parasitas nos eritrócitos, aparecem principalmente em pares, solitários ou formando a característica “cruz de Malta”, no entanto outras formas, como as encontradas em processo de divisão, foram ocasionalmente observadas. Os organismos solitários e em pares apresentavam-se redondos, ovais ou piriformes. Segundo este trabalho, 92% de todos os organismos observados encontravam-se como um organismo singular no interior dos eritrócitos, ao passo que as formas pares contavam com apenas 5,2%. Apenas 2,4% dos organismos observados tomavam a forma de “cruz de Malta” (Mahoney *et al.*, 1977).

Contudo, mesmo em casos clínicos agudos de *B. caballi* e *T. equi*, a parasitemia é muito baixa, variando entre 0,1-10% e 1-20%, respectivamente, o que pode dificultar a detecção dos parasitas nos esfregaços sanguíneos.

Quanto aos animais portadores sãos da doença, o facto de não apresentarem sinais aparentes da doença constitui um problema de diagnóstico (Ali *et al.*, 1996). A identificação de animais portadores através da análise microscópica de esfregaços sanguíneos, torna-se

não apenas difícil como também pouco precisa (De Waal & Van Heerden, 2004). Assim sendo, o resultado negativo obtido pelo exame microscópico não exclui a presença de infecção (OIE, 2004).

Dada a grande dificuldade no diagnóstico dos organismos em animais portadores através da análise de esfregaços sanguíneos, para além de não ser prático em larga escala, a testagem serológica é o método de diagnóstico preferido, especialmente quando os cavalos se destinam à importação por países onde a doença não ocorre, mas onde o vector está presente (Hinchcliff *et al.*, 2004). Como exemplos destas técnicas figuram o teste de fixação do complemento (FC), testes ELISA e teste de imunofluorescência indirecta de anticorpos (IFI).

De entre estas técnicas, os testes IFI e de fixação do complemento apresentam-se, actualmente, como os testes prescritos no que respeita a testagem de animais para trocas internacionais (OIE, 2004). Contudo, como todo o teste de imunodiagnóstico, o teste de FC possui falhas, em que são considerados os falsos positivos ou negativos. Há vários factores que podem conduzir a um diagnóstico falso negativo tais como a produção de imunoglobulinas menos hábeis em fixar o complemento e o uso de fármacos para terapia da babesiose/theileriose. O teste não detecta portadores assintomáticos, em que a infecção é latente, pois estes animais apresentam uma maior produção de anticorpos da classe IgG de resposta secundária e principalmente das subclasse IgG2, IgG4 e IgG(T), que não são boas fixadoras de complemento. Os falsos positivos podem ocorrer em poldros que apresentem anticorpos maternos adquiridos via colostro, por imunidade passiva e que com o tempo reduziram até desaparecerem (Pereira *et al.*, 2004).

O teste IFI foi aplicado com sucesso no diagnóstico diferencial de infecções por *T. equi* e *B. caballi*, mantendo-se o título de anticorpos positivo durante a fase latente da infecção (OIE, 2004; Hinchcliff *et al.*, 2004). O reconhecimento duma reacção positiva forte é relativamente simples, embora a diferenciação entre reacções positivas e negativas fracas requeira uma experiência considerável na sua interpretação (OIE, 2004).

Os testes ELISA podem ser também usados na detecção de anticorpos para ambas as espécies em cavalos infectados, não sendo recomendados como um teste de diagnóstico diferencial pois ocorrem reacções cruzadas entre *T. equi* e *B. caballi*. Contudo, recentes avanços usando proteínas recombinantes de merozoítos de *T. equi* e *B. caballi* e anticorpos monoclonais para essas proteínas em ELISA de inibição por competição, parecem ser bastante promissoras. O teste de ELISA por competição parece ser, no entanto, superior aos testes de FC, especialmente na detecção de animais infectados a longo termo nos quais o título de FC decaiu mas que permanece IFI seropositivo. Contrariamente ao ELISA indirecto, o ELISA por competição demonstrou ser altamente específico para ambas as espécies envolvidas (OIE, 2004).

O valor do diagnóstico pelos métodos serológicos é, no entanto, limitado pela impossibilidade de diagnosticar infecções pré-patentes, pela persistência de títulos de anticorpos após recuperação natural ou quimioterapia, bem como a dificuldade na interpretação de baixos títulos. Resultados altamente positivos fornecem um diagnóstico definitivo, enquanto que resultados serológicos negativos não excluem infecção, e os títulos de anticorpos não têm relação directa com a parasitemia (Ali *et al.*, 1996).

O uso de técnicas de PCR e culturas *in vitro* já foram descritas como diagnóstico de piroplasmose equina e, se disponíveis, poderão ser bastante úteis na detecção de animais portadores (Hinchcliff *et al.*, 2004).

Embora se trate de um procedimento incómodo e dispendioso, a inoculação de sangue infectado (500ml) em animais susceptíveis, de preferência esplenectomizados, para identificação de portadores pode ser uma técnica bastante útil no diagnóstico desta afecção. Posteriormente, é essencial que o animal receptor seja mantido sob observação constante de sinais clínicos de doença, sendo o diagnóstico confirmado pela presença de parasitas nos eritrócitos do mesmo (De Waal & Van Heerden, 2004).

Animais portadores podem também ser identificados através de xenodiagnóstico. Nesta técnica uma carraça específica, livre de doença, é alimentada num animal suspeito, podendo o organismo ser seguidamente identificado na própria carraça, ou num animal susceptível, após ter sido permitido que carraça se alimente no mesmo (OIE, 2004; De Waal & Van Heerden, 2004).

2.9.1. DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS

Os sinais clínicos de piroplasmose equina são normalmente inespecíficos, e a doença poderá ser confundida com uma grande variedade de condições (De Waal & Van Heerden, 2004).

Um síndrome observado nos equinos, que engloba patologias associadas a um quadro clínico de febre recorrente de origem desconhecida, sem sintomatologia característica, foi designado por um grupo de veterinários franceses como Síndrome “Piro-Like”. Podendo ser acompanhado por icterícia, anemia ou edemas periféricos, o diagnóstico diferencial deste síndrome inclui em primeiro plano a piroplasmose, bem como:

- Erliquiose (ou anaplasmoses) equina;
- Anemia infecciosa equina;
- Borreliose (doença de Lyme);
- e Leptospirose.

A maioria das patologias incluídas neste diagnóstico diferencial podem manifestar-se através de sinais mais específicos, tais como distensões articulares com claudicação intermitente no caso da borreliose, uveíte ou aborto na borreliose e leptospirose, e petéquias

ou edemas periféricos nos casos de erliquiose e de anemia infecciosa equina. (Sandersen, Pitel & Amory, 2007)

A borreliose ou doença de Lyme, produzida pela espiroqueta *Borrelia burgdorferi*, transmitida por carrapatos do género *Ixodes ricinus*, apresenta um elevado número de casos seropositivos assintomáticos. Como sinais clínicos destacam-se a febre moderada, letargia, anorexia, miosite, artrite com distensões articulares, claudicações esporádicas, uveíte anterior, emagrecimento crónico, encefalite e aborto.

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial provocada por espécies do género *Leptospira*. Cerca de 80% de equinos saudáveis possuem anticorpos contra *Leptospira* spp., no entanto, os casos clínicos são raros e incluem principalmente aborto, mortalidade perinatal e uveíte aguda ou recorrente.

Quanto à erliquiose equina, causada pela rickettsia *Anaplasma phagocytophilum* (antigamente denominada *Ehrlichia equi*), também transmitida por carrapatos do género *Ixodes* apresenta nos primeiros dias de infecção hipertermia, que varia entre 38,5°C e 41,6°C, seguida, depois de 3 a 5 dias por sinais mais severos tais como depressão, letargia, anorexia, edemas dos membros, petéquias, icterícia, ataxia, orquite e recusa de efectuar movimento. Trata-se de uma doença auto-limitante após 10 a 14 dias. Durante a fase clínica da doença podem observar-se, nos esfregaços sanguíneos, as morulas de *Anaplasma phagocytophilum* nos neutrófilos ou eosinófilos circulantes.

O vírus da anemia infecciosa equina, um lentivírus, da família Retroviridae, é transmitido pela picada de um insecto hematófago de um cavalo portador do vírus, a outro animal são. Apresenta distribuição mundial, sobretudo em regiões quentes e húmidas, e no que respeita à União Europeia, apenas a Roménia é considerada oficialmente endémica. É possível a sua transmissão transplacentária e iatrogénica. O período de incubação é de 1 a 3 semanas, por vezes mais, caracterizando-se os sinais clínicos, na fase aguda, por febre alta (40°C a 41°C), depressão, anorexia acompanhada de trombocitopénia e diátese hemorrágica com petéquias e epistaxis. Uma vez ultrapassado o estado agudo, na maioria dos casos, o animal recupera e torna-se clinicamente normal por um período variável, entrando na fase crónica da doença, após alguns dias ou semanas. Na fase crónica, verificam-se episódios recorrentes de febre e de depressão acompanhados de trombocitopénia e eventualmente anemia. Em casos raros, pode transformar-se numa doença crónica debilitante verificando-se emagrecimento, edemas de regiões em declive, anemia e eventualmente morte (Amory & Pitel, 2007).

Para além destes possíveis diagnósticos, um síndrome de anemia hemolítica aguda, deve ainda sugerir os seguintes diagnósticos alternativos:

- Isoeritrólise neonatal, que ocorre alguns dias após a ingestão de colostro e é normalmente apirético, detectável apenas em exames laboratoriais para evidência de incompatibilidade entre o soro da égua e os eritrócitos do poldro;

- Rabdomiólise de esforço, sempre associada a exercício vigoroso recente e elevação nos níveis de creatina fosfoquinase sérica;
- Forma cardíaca da peste equina africana, que apresenta lesões edematosas semelhantes às da babesiose, mas não manifesta hemoglobinúria ou icterícia (De Waal & Van Heerden, 2004; Radostits *et al.*, 2007);
- Falha hepática com anemia hemolítica, que se trata de um síndrome intravascular hemolítico, súbito e rapidamente progressivo, de causa desconhecida, possivelmente associado ao aumento da fragilidade osmótica dos eritrócitos. À intensa icterícia juntam-se a hemoglobinemia e hemoglobinúria, apresentando-se o prognóstico muito desfavorável (Zaugg, 2002).

2.10. TRATAMENTO E PROGNÓSTICO

O primeiro objectivo, em que se baseia a terapêutica da piroplasmose equina, consiste na resolução dos sinais clínicos, o segundo centra-se na eliminação dos parasitas do sangue de equinos afectados (Hinchcliff *et al.*, 2004).

As “pequenas” (*T. equi*) e “grandes” (*B. caballi*) babesias dos equinos seguem o mesmo padrão de susceptibilidade às drogas que as “pequenas” (*B. bovis*) e “grandes” (*B. bigemina*) babesias dos bovinos, sendo as pequenas babesias geralmente mais resistentes ao tratamento que as maiores. As infecções agudas respondem aos mesmos medicamentos utilizados no gado bovino, no entanto, as doses necessárias são normalmente maiores (De Waal & Van Heerden, 2004). Embora a recuperação clínica seja normalmente atingida, as infecções por *T. equi*, são difíceis de eliminar com os fármacos actualmente disponíveis e os animais permanecem portadores, provavelmente para toda a vida. A eliminação de infecções por *B. caballi* é, contudo, raramente recomendada em áreas endémicas (Hinchcliff *et al.*, 2004).

Uma grande variedade de fármacos tem sido utilizada no tratamento da piroplasmose equina, com resultados variados, não estando o protocolo de eleição ainda bem estabelecido (De Waal & Van Heerden, 2004; Radostits *et al.*, 2007). O tratamento baseia-se no uso de drogas que combatam a fase aguda da doença, mas sabe-se que as drogas utilizadas causam vários graus de toxicidade ao hospedeiro, dependendo principalmente das doses a que são administradas (Nogueira *et al.*, 2005).

O dipropionato de imidocarb (Imizol®) é a droga mais utilizada na terapêutica desta afecção. No entanto, foi provada a sua toxicidade em níveis terapêuticos, estando descritos alguns casos de morte pelo tratamento (Irby, 2002). Foi demonstrado que a LD₅₀, em equinos, no caso do imidocarb administrado por duas vezes no intervalo de 48 horas, é de 16 mg/kg (De Waal & Van Heerden, 2004).

Os mecanismos através dos quais os babesicidas actuais inibem o desenvolvimento de *Babesia* spp. no interior dos eritrócitos encontram-se muito pouco conhecidos. É sugerido

que o imidocarb bloqueia a entrada de inositol nos eritrócitos contendo *Babesia* spp., impossibilitando a alimentação por parte do parasita (Vial & Gorenflot, 2006). Pensa-se também que este fármaco, ao actuar através da combinação com o DNA dos organismos susceptíveis, provoca a sua desnaturação e desenrolamento. Este dano provocado no DNA destes organismos parece inibir a reparação e replicação celular.

Com uma administração de 2,2 mg/kg, por via intramuscular, o dipropionato de imidocarb normalmente permite a resolução dos sinais clínicos associados às infecções por ambos os organismos (De Waal & Van Heerden, 2004; Plumb, 2005). Efeitos secundários tais como agitação, cólica e sudação são frequentes após o tratamento. Para evitar a ocorrência destas situações, é recomendada a administração de sulfato de atropina na dose de 0,1 mg/kg, intramuscular e de 1 mg/kg de flunixin meglumine, por via intravenosa, cerca de trinta minutos antes de cada tratamento. Tendo sempre em atenção que a administração de atropina, nesta dose, pode produzir íleo grave no cavalo (Irby, 2002).

A quimioesterilização de infecções causadas por *Babesia* spp. é raramente recomendada, contudo pode ser indicada quando os cavalos estão para ser transportados de um país endémico para outro, livre de doença (De Waal & Van Heerden, 2004). No caso de infecções por *B. caballi*, recomenda-se a administração intramuscular de 2 mg/kg de imidocarb, durante dois dias consecutivos. Quanto às infecções por *T. equi*, embora seja mais difícil a sua esterilização, regista-se algum sucesso na dose de 4 mg/kg administrada por quatro vezes, com intervalo de 72 horas (Plumb, 2005). No entanto, os resultados de um estudo levado a cabo por Butler *et al.* (2008) sugeriram que mesmo utilizando doses elevadas de imidocarb (4,7 mg/kg IM, cada 72h), durante cinco tratamentos consecutivos, este não conseguiu a eliminação de *T. equi* e *B. caballi* de animais portadores saudáveis (Butler *et al.*, 2008).

Para além do dipropionato de imidocarb, outras diamidinas aromáticas e compostos relacionados como o diaceturato de diminazeno (Berenil®) e o diisetionato de amicarbalide (Diampron®) são eficazes contra ambos os organismos. Contudo, podem ser necessários tratamentos repetidos para controlar infecções por *T. equi*. Os derivados de acridina, como a euflavina, numa dose recomendada de 4 a 8 ml/100 kg, a 5%, com um volume máximo de 20ml, administrada por via intravenosa cuidadosamente, são também eficazes para *T. equi* e *B. caballi*. Administrações subcutâneas destes compotos causam irritação elevada dos tecidos no local da injeção, sendo recomendada a administração IM simultânea de atropina por forma a combater os potenciais efeitos parassimpaticomiméticos desta droga (De Waal & Van Heerden, 2004).

A administração de um volume de 150 a 200 ml de “azul de tripan”, IV, numa solução a 2%, apenas tem efeito sobre *B. caballi*, apresentando a desvantagem de produzir a descoloração de vários tecidos do animal sendo, por este motivo e pelo facto de terem sido desenvolvidas drogas mais eficazes, agora raramente utilizado. Tetraciclinas, como hidrocloreto de

tetraciclina e oxitetraciclina, são eficazes apenas contra *T. equi*, quando administradas IV diariamente, por dois ou mais dias, com uma dosagem de pelo menos 5,5 mg/kg. Resultados preliminares indicam que parvaquone, uma droga anti-theileria, pode ser eficaz no tratamento de infecções por *T. equi* em cavalos, embora não elimine a infecção (De Waal & Van Heerden, 2004).

Dependendo da gravidade do caso, é por vezes necessária terapia de suporte podendo incluir infusões de fluidos e/ou sangue, bem como administração IV de fosfolípidos essenciais e antibióticos. Infusões de soluções electrolíticas devem ser consideradas para animais bastante desidratados, apresentando anorexia ou sofrendo diarreia. Laxantes orais podem também ser indicados (De Waal & Van Heerden, 2004).

Resumindo, parece evidente que nenhuma das drogas babesicidas existentes, apresentam resultados satisfatórios na esterilização das infecções por *T. equi* (De Waal & Van Heerden, 2004), daí que o desenvolvimento de uma droga eficaz e compatível que eliminasse as infecções por *T. equi*, seria certamente um grande avanço (Ali *et al.*, 1996).

Caso seja diagnosticada antecipadamente e tratada rapidamente, a recuperação é a regra (Zaugg, 2002), mesmo sem a eliminação completa do agente etiológico (Hinchcliff *et al.*, 2004). Contudo, caso o animal não seja sujeito a tratamento, a evolução é frequentemente desfavorável originando-se uma anemia grave acompanhada de uma fraqueza generalizada, podendo o animal sucumbir (Amory & Pitel, 2007; Radostits *et al.*, 2007).

2.11. CONTROLO E PREVENÇÃO

Pelo facto dos agentes responsáveis pela piroplasmose equina serem transmitidos por carraças, o seu controlo é uma medida preventiva vital (AVMA, 2006). O número de carraças e, por conseguinte, a quantidade de infecções por *Babesia* spp. podem ser reduzidas através da aplicação regular de sprays ou banhos acaricidas aos animais (Urquhart *et al.*, 1996).

As estratégias de controlo de Ixodídeos são largamente baseadas no uso de acaricidas químicos aplicados aos animais ou no ambiente, sendo as piretrinas, os piretróides, os organofosfatos e os carbamatos normalmente usados como substâncias activas.

Os compostos de piretroides e os organofosfatos fornecem 3 a 5 semanas de actividade residual após a sua aplicação, afigurando-se as formulações de piretrina mais seguras, tanto no equino como no ambiente, pelo facto de serem rapidamente metabolizadas ou oxidadas. Diversas formulações de compostos piretróides proporcionam 3 a 4 semanas de actividade residual no equino, sendo eficazes contra carraças e insectos.

Os organofosfatos e os carbamatos partilham o mesmo mecanismo de acção e podem ter efeitos aditivos que podem conduzir à toxicidade, caso sejam usados concomitantemente, com outros inibidores da acetilcolinesterase, particularmente quando se tratam de compostos de longa acção. Os sprays podem ser aplicados em áreas de arbusto ou de erva

que tenham sido cortadas. No cavalo devem ser aplicados nas zonas onde as carraças se costumam acumular, como são o caso dos membros, ventre e pescoço, cabeça e orelhas.

O corte de áreas de arbusto e ervas longas, utilizados pelo vector biológico em busca de hospedeiro, vão auxiliar o programa de controlo global, reduzindo o potencial reprodutivo das carraças, bem como aumentando a eficácia da aplicação de um spray químico, ao remover a vegetação em excesso (Hinchcliff *et al.*, 2004). O controlo da entrada de animais domésticos e selvagens, incluindo roedores, nas cavalariças é também um aspecto importante no controlo de carraças, pois estes animais podem transportar consigo vectores com capacidade de transmissão dos agentes da piroplasmose equina, para além de outros problemas associados à presença desses animais nestes locais (AVMA, 2006).

Em sistemas de manejo intensivo, onde os animais recebem diariamente cuidados individuais, é provavelmente exequível o controlo da doença através da eliminação do contacto entre a carraça vector e o hospedeiro equino, pela aplicação regular de um acaricida. No entanto, em sistemas intensivos em que os animais se encontram livremente a campo, já será bastante difícil, se não mesmo impossível, controlar estes vectores eficazmente. O controlo estratégico de carraças irá expor os poldros aos vectores e permitir que estes desenvolvam imunidade cedo, o que resultará em estabilidade endémica.

Para conseguir uma limitação na prevalência da doença a níveis económicos sustentáveis, é necessário adoptar diferentes soluções para diferentes circunstâncias, baseando-se largamente no controlo da população de carraças, através da aplicação frequente de acaricidas, quimioterapia e em menor grau através da vacinação dos hospedeiros. Estas medidas são, no entanto, apenas parcialmente eficazes, consumindo muito tempo e dinheiro.

Não se encontram disponíveis vacinas, pelo que animais susceptíveis introduzidos em áreas endémicas deverão ser cuidadosamente observados nos primeiros meses após a sua chegada, e tratados quando necessário (Urquhart *et al.*, 1996; De Waal & Van Heerden, 2004). Um programa vacinal para equinos, que participem em eventos desportivos, com merozoítos atenuados ou antígenos inactivados poderia ser desejável, porém pelas características particulares do mercado de cavalos e situação epidemiológica actual, a vacinação deve equacionar-se em moldes diferentes da vacinação de outras espécies. Seriam, portanto, apenas aceitáveis vacinas que permitissem distinguir a resposta vacinal da resposta à infecção natural, ou seja, através de vacinas marcadas (Ali *et al.*, 1996; Malta, 2001).

Uma das razões pelas quais as autoridades dos países indemnes de piroplasmose equina se preocupam com a introdução da doença no seu território prende-se com o facto da maioria dos animais nunca terem sido expostos aos parasitas, e as diferentes espécies de carraças capazes de transmitirem a doença se encontrarem presentes nesses países. Uma outra importante razão, para o rigoroso controlo, realizado através dos já referidos testes,

relaciona-se com o facto de cavalos com infecções por *B. caballi* ou *T. equi* poderem ser portadores do parasita no seu sangue durante vários anos, mesmo que recuperem da infecção inicial. Apesar de se apresentarem saudáveis, estes animais portadores podem transmitir os parasitas às carraças, constituindo uma fonte de manutenção e disseminação dos organismos pela população equina. Adicionalmente, não se encontram disponíveis nenhuns tratamentos que eliminem completamente o parasita, permitindo a existência de mais portadores inaparentes.

Assim sendo, o método mais fiável no controlo da piroplasmose equina continua a ser a prevenção da entrada de animais infectados, assegurando que os equinos provenientes de países endémicos sejam sujeitos a uma verificação cuidada e que se encontrem livres de carraças. A entrada de cavalos com anticorpos para os agentes da piroplasmose equina apenas é permitida em circunstâncias específicas, sendo estes rigorosamente mantidos em quarentena e isolados de animais susceptíveis. Podem inclusive, em determinadas circunstâncias, ser submetidos a eutanásia animais que tenham apresentado resultados positivos nos testes após importação (AVMA, 2006).

A título de exemplo, na Florida, de forma a prevenir um novo surto, como o que ocorreu nos anos 1960, é agora requerido uma permissão de importação referindo o destino do cavalo, sendo o animal mantido em quarentena para uma re-testagem 30 a 60 dias após a sua entrada no país, cabendo os custos ao proprietário. Isto aplica-se a todos os equinos que tenham resultado negativo no teste de FC na estação de importação da United States Department of Agriculture, e que provenham de países em que a doença ocorre. Quanto aos animais que apresentem resultado negativo, após terem resultado positivo, são mantidos em quarentena até serem submetidos a três testes de FC negativos consecutivos, com 30 dias de intervalo entre eles (Irby, 2002).

Encontram-se também instituídas medidas de controlo da população de carraças, bem como a utilização de animais sentinela colocados em isolamento e testados periodicamente para anticorpos contra agentes da piroplasmose equina (AVMA, 2006). A monitorização da população de carraças pode ser exigida por patrocinadores de eventos equestres internacionais, devendo, no entanto, esta ser praticada ocasionalmente em todas as instalações equinas onde existam carraças. Esta monitorização pode ser de grande utilidade para demonstrar a eficácia de programas de controlo implementados e fazer sobressair áreas que necessitem de modificações adicionais ou aplicação de acaricida, com vista à redução da infestação (Hinchcliff *et al.*, 2004).

Por estes motivos, a piroplasmose equina tem-se revestido de grande importância internacional, representando uma importante restrição ao movimento de equinos envolvidos em trocas comerciais ou eventos desportivos.

3. OBJECTIVOS DO PRESENTE ESTUDO

Em primeiro lugar, com a realização deste trabalho, pretendemos avaliar a possibilidade de ocorrência de transmissão transplacentária dos agentes da babesiose e theileriose equinas, através da análise de esfregaços sanguíneos de éguas puro sangue Lusitano e seus poldros. Para o efeito escolhemos a Coudelaria da “Companhia das Lezírias, S.A.” (CL), não só pela sua dimensão, qualidade coudélica e proximidade de Lisboa, mas também por se encontrar numa zona endémica de hemoprotozooses equinas, ou seja, a lezíria e a charneca do Ribatejo.

Em segundo lugar, levámos a cabo um levantamento da situação epidemiológica da doença no efectivo equino desta coudelaria, recorrendo ao mesmo método de diagnóstico.

Finalmente, pretendemos fazer o acompanhamento clínico-sanitário da babesiose e theileriose equinas nos animais propriedade da Coudelaria da CL.

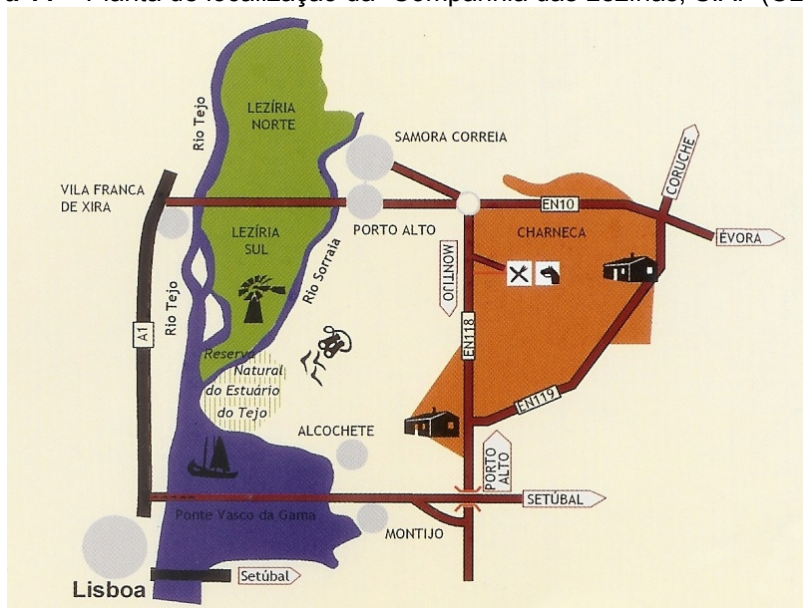
4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DA EXPLORAÇÃO AGRO-PECUÁRIA

Os estudos levados a efeito neste trabalho foram realizados em equinos domésticos na “Companhia das Lezírias, S.A.” (CL).

A Companhia das Lezírias é a maior exploração agro-pecuária e florestal existente em Portugal, situada a cerca de 40 kms a nordeste de Lisboa, ocupando uma área de 22000 ha, distribuída pela Lezíria de Vila Franca de Xira e Charneca do Infantado, na Região Agrícola do Ribatejo e Oeste.

Figura 11 – Planta de localização da “Companhia das Lezírias, S.A.” (CL, 2008)



Trata-se de uma Sociedade Anónima de Capitais Públicos com sede em Samora Correia e cuja actividade é desenvolvida nas áreas agrícola (milho, arroz, vinha, olival, girassol e luzerna), florestal (sobreiro, eucalipto e pinheiro), pecuária (bovinos de carne e equinos) e do agro-turismo. Esta empresa foi constituída em 1836, remontando as primeiras existências de gado cavalar a 1896, embora apenas em 1929 se tenha iniciado a selecção equina com a inscrição de éguas na Comissão de Remonta do Exército. A partir de 1976 expandiu-se a produção de equinos de recria e desporto com especial evidência para os cavalos Lusitano e Cruzado Português, tendo a evolução do efectivo estabilizado desde 1989 (Madeira de Carvalho, 2001).

A Coudelaria da CL está sediada no Monte Braço de Prata (38° 52' N, 8° 51' W, a 20 m de altitude) e abrange uma vasta área vedada da exploração. Esta exploração coudélica apresenta diversas infra-estruturas ligadas à produção e alojamento de equinos, de entre as quais se destacam:

- Duas cavalariças, com capacidade para 20 e 18 cavalos (esta última para alojamento de animais a penso, principalmente de particulares);

- Três picadeiros (um coberto e dois exteriores);
- Complexo desportivo constituído por campos de ensino, de saltos (relvado) e de obstáculos para atrelagem.

Próximo deste complexo, a coudelaria apresenta um Centro de Reprodução (com “mangas” e parques de confinamento) utilizado para pequenas intervenções cirúrgicas e de carácter sanitário, tais como vacinações e desparasitações. Junto a este Centro existem 2 parques e 4 folhas de pastagem natural (com uma área total de 130 ha) utilizadas pelas éguas de ventre (cerca de 30) e garanhões durante o período de cobrição (de Janeiro a Abril). São também utilizadas pelos poldros após o desmame (com 6 a 8 meses de idade) e durante a recria (com 8 meses a 1 ano de idade).

Os poldros de 1 a 3 anos de idade são mantidos na pastagem até ao desbaste, nomeadamente nas folhas de pastagem natural próximas da coudelaria e do Centro de Reprodução.

A preferência desta exploração para a realização deste ensaio deveu-se sobretudo aos seguintes pontos:

1. Importância da CL no panorama da produção equina nacional;
2. Efectivo equino que permite a execução da experimentação em animais estabulados e em pastoreio;
3. Localização no Ribatejo, um dos solares da raça Lusitana.

4.1.1. CARACTERIZAÇÃO CLIMÁTICA

Este subcapítulo é baseado no trabalho levado a cabo por Madeira de Carvalho (2001).

A evapo-transpiração real média para esta zona é de cerca de 453 mm/ano e é previsível que ocorram cinco meses de défice de água no solo, num total de 322 mm/ano (de Maio a Setembro, com particular incidência em Julho e Agosto). Por outro lado também deverão ocorrer, em média, quatro meses com excesso de água no solo, num total de 142 mm/ano (de Dezembro a Março).

Segundo registos meteorológicos das estações climatológicas de Salvaterra de Magos e do Montijo/Base Aérea, as mais próximas do local escolhido para o nosso estudo, realça-se o facto de ambas apresentarem temperaturas e humidades relativas do ar bastante semelhantes, encontrando-se ligeiras diferenças nos valores de precipitação média anual e diferenças mais acentuadas na evaporação média anual e no número de dias de nevoeiro, referentes ao período compreendido entre 1951 e 1980.

Verifica-se, em ambos os casos, que cerca de 75% da precipitação ocorre durante os seis meses mais frios, de Novembro a Abril, enquanto que os quatro meses de Junho a Setembro poderão ser considerados como meses secos, na medida em que apresentam uma precipitação média mensal inferior ao dobro da temperatura média mensal respectiva. O clima desta região é assim considerado como continental atenuado, com as seguintes

características: temperado quanto à temperatura média anual, moderado na amplitude média da variação anual, húmido relativamente à humidade relativa do ar e moderadamente chuvoso quanto à precipitação.

Concluindo, alguns estudos climatológicos da zona onde se situa a Coudelaria da CL consideram o ano dividido unicamente em duas estações, uma predominantemente fria e chuvosa (estação húmida que começa depois de 1 de Outubro) e outra quente e seca (estação seca que começa antes de 1 de Maio).

4.1.2. SOLOS E VEGETAÇÃO

A Companhia das Lezírias está situada na “Região Ecológica da Charneca Pliocénica do Ribatejo” ou peneplanície ribatejana (lezíria), apresentando solos, em geral, de textura ligeira, com excepção dos solos de características aluviais.

Localizada junto à bacia terciária do Tejo, a lezíria encontra-se preenchida por terrenos recentes das duas últimas eras geológicas (Terciário e Quaternário). A leste do Tejo (área de localização da CL), encontramos a bacia miocénica do mesmo rio e terrenos modernos que incluem aluviões fluviais e depósitos de praias antigas com rochas detríticas arenosas e argilosas, predominando os solos do tipo Aluviossolos e Regossolos. Estes são considerados respectivamente solos Podzolizados e solos Incipientes pela classificação portuguesa (Madeira de Carvalho, 2001).

Na região do Ribatejo poucas são as superfícies agrícolas não cultivadas. Prados, pastagens, campos de milho, de arroz, de luzerna, de culturas hortícolas e vinhas predominam na zona de implantação da CL, alternando as plantações com terras aráveis e bosques. Destes destacam-se os de sobreiro (*Quercus suber*), pinheiro bravo (*Pinus pinaster*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*), aos quais estão associados sub-bosques de plantas arbustivas, tais como o zimbro (*Juniperus oxycedrus transtagana*), o carrasco (*Quercus coccifera*) e o alecrim (*Rosmarinus officinalis*).

Nos locais de estudo foram identificadas, por Docentes do Instituto Superior de Agronomia, as seguintes plantas no estrato herbáceo: aveia (*Avena sativa*), cevada-dos-ratos (*Ordeum murinum*), margaça (*Chamaemelum mixtum*), azevém espontâneo (*Lolium rigidum*), azevém perene (*Lolium perenne*), anafa (*Melilotus segetalis*), grama (*Cynodon dactylon*), soagem (*Echium plantaginium*), saramago (*Raphanus raphanistrum* spp. *microcarpus*), panasco (*Dactylis lusitanica*), esparguta (*Spergula arvensis*), trevo branco (*Trifolium repens*), trevo vermelho (*Trifolium fragiferum*), trevo escamoso (*Trifolium squamosum*), erva gorda (*Archtotecta calendula*), junco (*Juncus bufonius*), malva bastarda (*Lavatera cretica*), ranúnculo botão de ouro (*Ranunculus trilobus*), tasneirinha (*Senecio vulgaris*), bolsa do pastor (*Caepocella rubella*) e corriola (*Convolvulus arvensis*) (Madeira de Carvalho, 2001).

4.1.3. SISTEMA DE PRODUÇÃO EQUINA

Na Coudelaria da CL o efectivo encontra-se dividido em dois grupos de produção: animais estabulados e em manadio (estes últimos agrupados por idade, sexo e estado fisiológico).

O sistema produtivo inicia-se com o nascimento dos poldros de Janeiro a Abril, principalmente no período Fevereiro/Março. De imediato, é efectuada a detecção do cio das éguas através da presença do garanhão, e aproveita-se o denominado “cio de poldro” (que ocorre 5 a 15 dias após o parto) para a cópula natural a campo, ocorrendo as cobrições de Fevereiro a Maio.

Os poldros de mama permanecem com as mães nas pastagens entre 6 a 8 meses, altura em que são desmamados (no momento do desmame procede-se também à ferra, às vacinações e desparasitações). As características climáticas descritas anteriormente para a zona da CL, condicionam a abundância das pastagens naturais nos meses de Primavera (Março, Abril, Maio) e Outono (nos anos em que chove cedo), pelo que a exploração procura aproveitar ao máximo as pastagens espontâneas durante estes períodos.

Os machos são separados das fêmeas desde o desmame, que pode ocorrer de Outubro a Dezembro, vivendo em abrigos ou parques separados, procedendo-se à suplementação da sua alimentação. Esta fase dos equinos jovens é denominada de recria, estendendo-se até Março do ano seguinte quando os animais apresentam uma idade próxima de 1 ano.

Após a recria, os machos e as fêmeas de 1 ano são agrupados respectivamente com os poldros e poldras de 2 e 3 anos de idade, também em parques separados.

Após atingirem os 3 anos de idade, machos e fêmeas têm destinos diferentes. Os machos serão estabulados e integrados num programa de desbaste e ensino para venda posterior (caso não sejam comercializados previamente) ou seleccionados como reprodutores e/ou equinos com aptidão para diversas modalidades hípcas ou de trabalho (cavalos utilizados pelos campinos). As fêmeas serão utilizadas preponderantemente para renovação da equada, embora algumas também possam ser comercializadas ou utilizadas como equinos de serviço da exploração.

A coudelaria da CL tem como principal objectivo a produção de Cavalos Puro Sangue Lusitano, comercializando-os tanto no mercado nacional como internacional .

4.2. AMOSTRAGEM

A avaliação hematológica foi realizada através da colheita de amostras de sangue periférico da veia jugular de 47 equinos, pertencentes ao efectivo equino da Coudelaria da CL.

Tendo como objectivo a avaliação da ocorrência de transmissão transplacentária de piroplasmose equina foram analisadas amostras de 10 neonatos, machos e fêmeas nos seus primeiros dez dias de vida, e das respectivas mães.

Para a avaliação da prevalência da doença no efectivo da Coudelaria da CL, para além dos animais já mencionados, foram realizadas colheitas de sangue a mais 14 poldros e poldras, com idades compreendidas entre os oito e os nove meses e a 12 cavalos adultos estabulados, bem como a uma égua a campo.

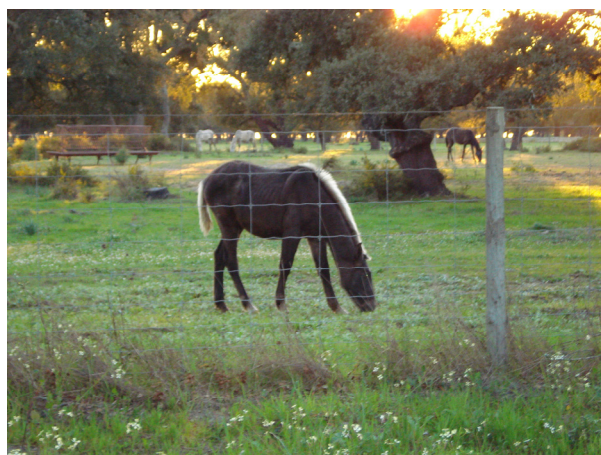
Figura 12 – Grupo constituído por éguas e seus poldros, numa das pastagens (Original).



Figura 13 – Equinos estabulados no Monte Braço de Prata (Original).



Figura 14 – Poldros de 8 a 9 meses de idade, numa das pastagens, próxima do Centro de Reprodução (Original).



Decidimos escolher estes animais, de forma a tentar obter uma amostragem de todos os grupos existentes no sistema de produção implementado na coudelaria. Os referidos

animais eram da raça Puro Sangue Lusitano, mantidos no sistema de produção já anteriormente descrito, no Monte de Braço de Prata, sede da Coudelaria da CL.

Na coudelaria em questão, todos os animais são vacinados anualmente contra o tétano e influenza equina (ProteqFlu-Te ® (Merial)), além de serem desparasitados com produtos à base de Ivermectina associada com Praziquantel (Equimax ® (Virbac)).

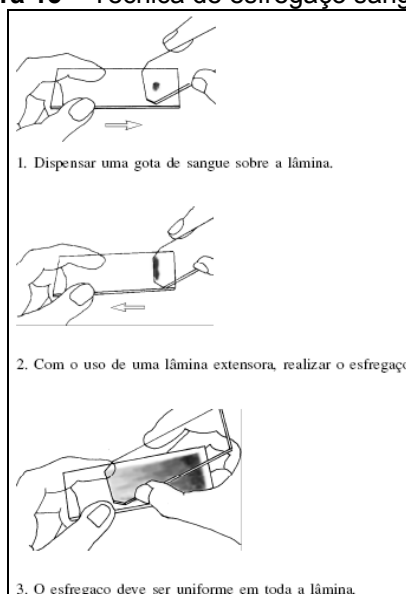
Todos os animais foram submetidos a um exame de estado geral, que se baseou na avaliação das frequências cardíaca e respiratória, coloração das mucosas oculares e orais, temperatura corporal, bem como observação da condição corporal e das condições de pele, pêlo e anexos.

4.3. COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue, com um volume de cerca de 2,5 ml, foram colhidas, após assepsia local, por punção da veia jugular, e de seguida, colocadas em frascos limpos contendo anti-coagulante (EDTA) e imediatamente acondicionadas no frigorífico a uma temperatura de 2 °C. Estas foram transportadas para o Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, no dia da recolha ou no dia seguinte, onde foi realizada a preparação dos esfregaços sanguíneos (pelo menos dois esfregaços por animal), bem como a sua posterior análise.

As operações de recolha das amostras sanguíneas realizaram-se em 2008, nos dias 27 de Novembro no caso dos poldros de oito a nove meses de idade, 14 de Dezembro nas recolhas aos cavalos estabulados e dia 25 de Março às éguas e respectivos poldros (ver Anexo 1). Neste trabalho recorreremos a esfregaços sanguíneos corados pelo método de Giemsa. Este método realiza-se colocando uma gota de sangue numa das extremidades de uma lâmina, correndo de seguida a gota, com o auxílio de uma lâmina ou lamela, de modo a formar um esfregaço fino e uniforme (figura 15).

Figura 15 – Técnica de esfregaço sanguíneo



Efectuámos a coloração pelo método de Giemsa rápido: espera-se que a película seque, para seguidamente a fixar em metanol absoluto durante cerca de 5 minutos, após os quais se cobre a lâmina com uma solução Giemsa e deixa-se a corar durante cerca de 1 minuto. Após este passo lava-se a lâmina em água corrente, deixando-se secar em posição vertical. Os parasitas poderão, assim, ser observados ao microscópio com a objectiva de 100X e apresentar-se-ão corados com citoplasma azul e núcleo magenta (Sloss, Kemp & Zajac, 1999).

As análises estatísticas realizadas neste ensaio foram processadas com o auxílio dos programas Excel Microsoft 2003 e pacote estatístico “GraphPad InStat Demo”, versão 3.06 de 2003.

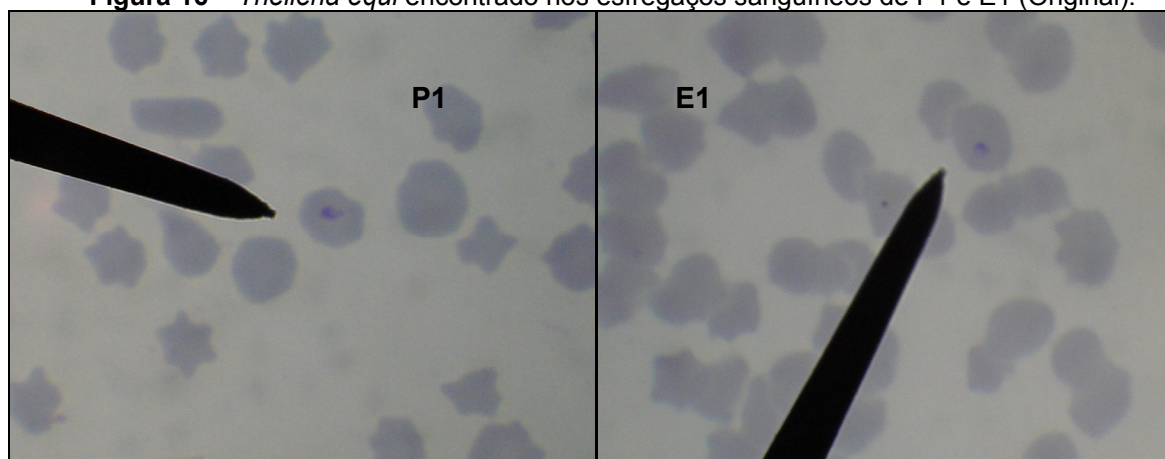
5. RESULTADOS

5.1. TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA DE *T. equi*

Os resultados encontrados foram apresentados pela distribuição percentual dos valores qualitativos entre positivos e negativos e suas relações entre éguas e poldros. Foi utilizado também, o teste exacto de Fischer de modo a avaliar as associações existentes nas distribuições encontradas entre éguas e poldros.

Os resultados das análises aos esfregaços sanguíneos realizadas às 20 amostras colhidas, 10 das quais pertencentes a poldros e as outras 10 às respectivas mães, evidenciaram a inexistência de infecção por *B. caballi*, neste grupo. Assim sendo, os resultados apresentados dizem respeito apenas a infecções por *T. equi* (figura 16).

Figura 16 – *Theileria equi* encontrado nos esfregaços sanguíneos de P1 e E1 (Original).



Estes resultados demonstraram que 5 (50%) das éguas apresentaram resultados positivos, e que as restantes 5 (50%) exibiram esfregaços sanguíneos negativos para *T. equi* (Tabela 8).

Tabela 8 – Resultados obtidos após análise de esfregaços sanguíneos de éguas e poldros com até 10 dias de idade

<i>Theileria equi</i>	Poldros Positivos	Poldros Negativos	TOTAL
Éguas Positivas	4	1	5
Éguas Negativas	0	5	5
TOTAL	4	6	20

Destas éguas cujo esfregaço sanguíneo resultou negativo para *T. equi*, a totalidade dos seus produtos apresentou-se também negativo. Contudo, os 4 (40%) poldros que se apresentaram positivos, eram todos eles descendentes de mães também positivas no dia da recolha (gráfico 8). Dos 6 (60%) poldros que resultaram negativos, 5 (50% da amostragem) deles eram descendentes de mães também negativas, sendo apenas 1 (10% da amostragem) produto de mãe positiva (gráficos 7 e 9).

Gráfico 7 – Representação da percentagem de poldros de mama, com resultados positivos e negativos na análise dos esfregaços sanguíneos, para *Theileria equi*.

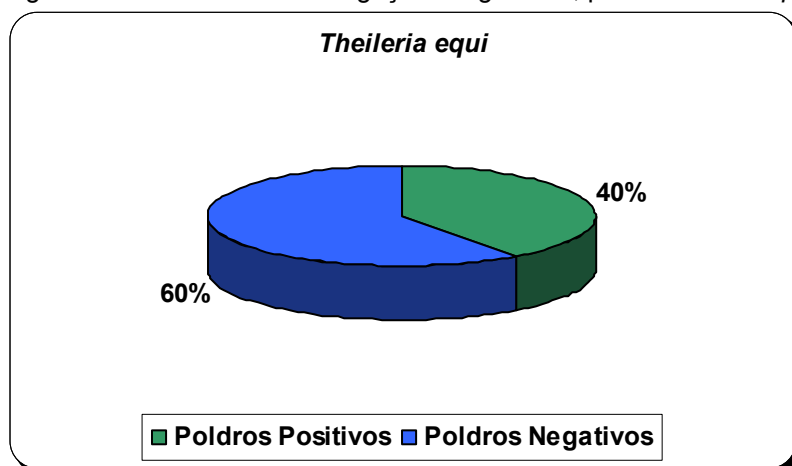


Gráfico 8 – Representação da percentagem de poldros positivos, descendentes de mães positivas

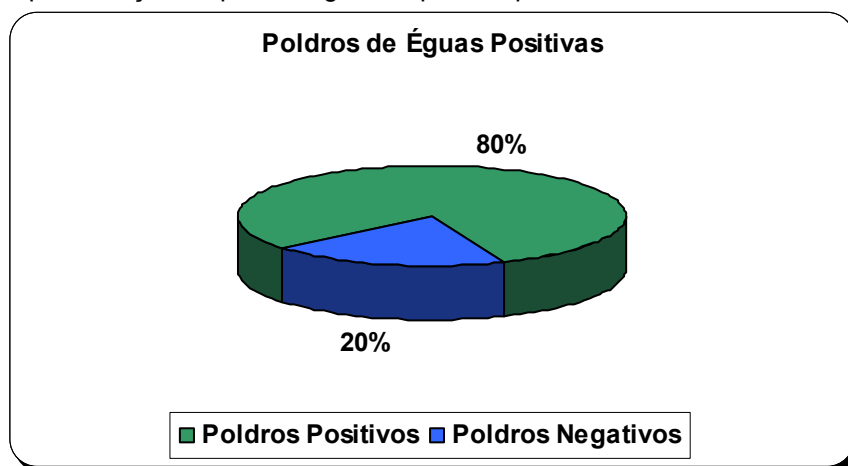
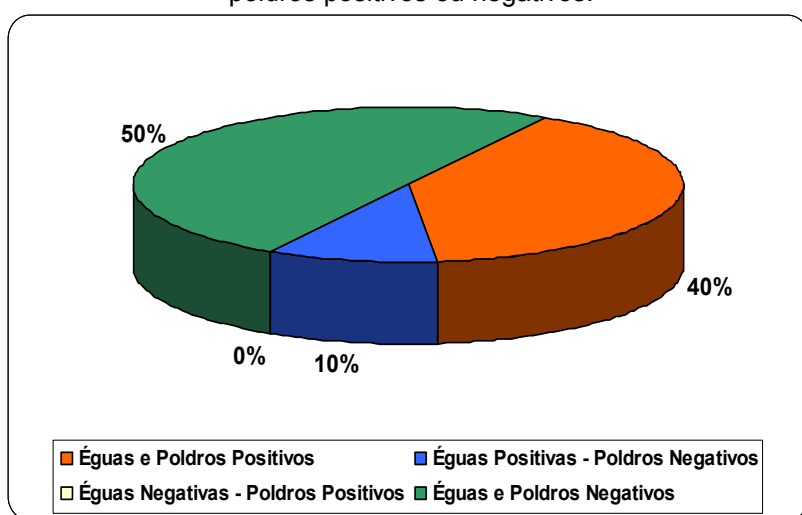


Gráfico 9 – Representação de éguas positivas ou negativas para *Theileria equi* e sua relação com poldros positivos ou negativos.



Após estes resultados terem sido submetidos ao teste Exacto de Fischer, verificou-se que existe associação significativa entre os resultados encontrados (“two-sided p” = 0,0476).

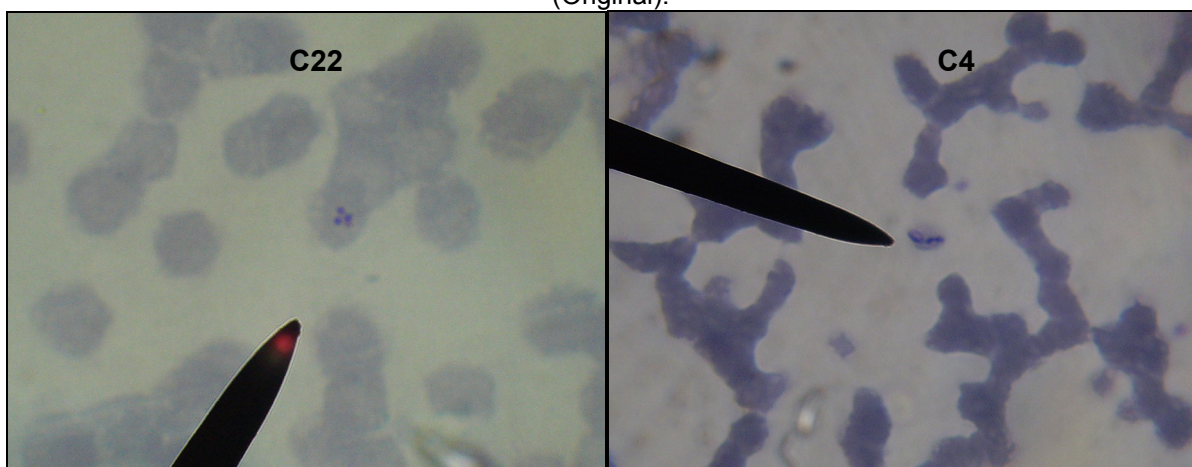
5.2. PREVALÊNCIA DE PIROPLASMOSE EQUINA

Para o estudo da prevalência da doença no efectivo equino da Coudelaria da CL, recorremos à análise de esfregaços sanguíneos de 47 animais, divididos em diferentes grupos tendo em conta a sua idade, sexo e sistema de produção em que se encontravam.

Assim, estes 47 animais encontram-se divididos nos 4 grupos descritos seguidamente:

- Poldros e poldras com oito a nove meses, em manadio (14 animais);
- Machos estabulados (12 animais);
- Éguas a campo (11 animais);
- e Poldros de mama com menos de dez dias de idade (10 animais).

Figura 17 – Esfregaços sanguíneo de equino estabulado C22 (à esquerda) e do poldro C4 (à direita) (Original).



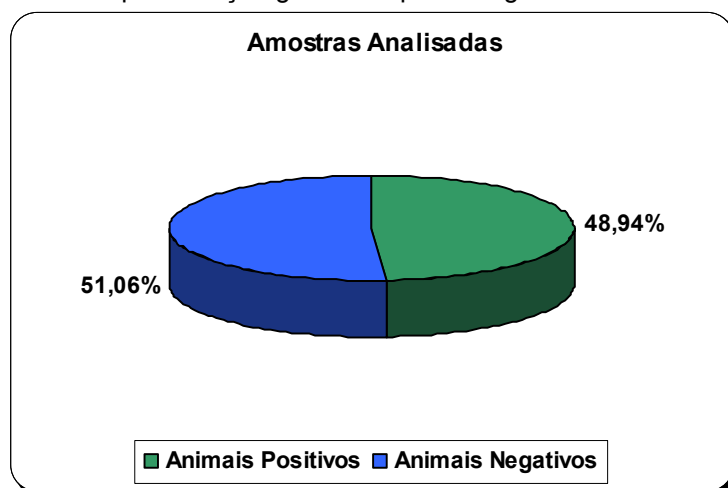
No esfregaço sanguíneo de C22 é possível observar *T. equi* no interior de eritrócito, apresentando uma estrutura semelhante à “cruz de Malta”. No esfregaço de C4 é encontrada *Babesia caballi* num glóbulo vermelho do animal.

Os resultados obtidos após a análise das amostras demonstraram a existência de 23 animais positivos (48,94%) de entre os 47 analisados, resultando, portanto, em 24 animais (51,06%) negativos para os agentes de piroplasmose equina (tabela 9 e gráfico 10).

Tabela 9 – Resultados obtidos após a análise da totalidade das amostras.

	Nº de Animais	Percentagem
Animais Positivos	23	48,94%
Animais Negativos	24	51,06%
TOTAL	47	100,00%

Gráfico 10 – Representação gráfica da percentagem de animais afectados.



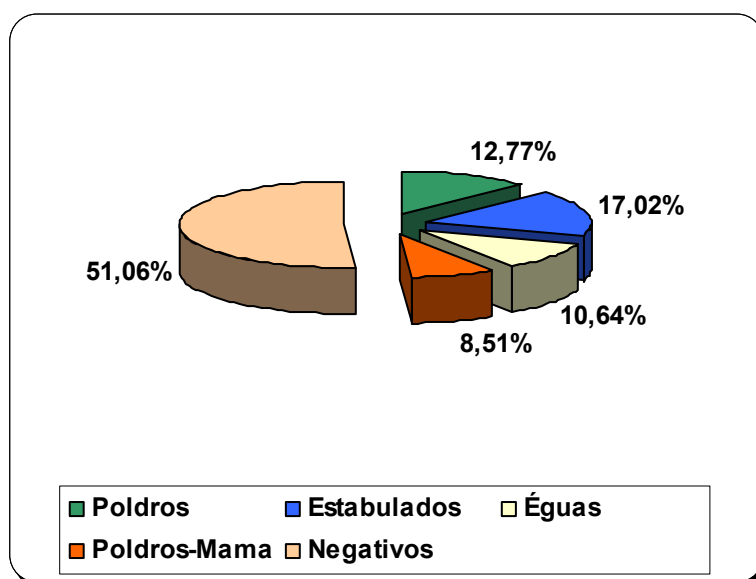
Ao analisar os resultados obtidos para os diferentes grupos estudados, conclui-se que de entre os 14 poldros e poldras com oito a nove meses analisados, 6 (42,86%) se apresentaram positivos para os agentes da piroplasmose equina, resultando os restantes 8 (57,14%) animais negativos. Metade dos animais positivos deste grupo eram positivos para *T. equi*, e a outra metade corresponde aos únicos 3 animais deste estudo que resultaram positivos para *B. caballi*.

No que respeita ao grupo constituído pelos 12 cavalos estabulados no Monte Braço de Prata, 8 (66,67%) amostras deram resultado positivo e 4 negativo (33,33%). Quanto às 11 éguas de ventre, que se encontram na pastagem durante todo o ano, 5 (45,45%) apresentaram resultado positivo para *T. equi*, ao passo que 6 (54,55%) resultaram negativas para ambos os agentes pesquisados. Por fim, no que respeita ao grupo composto pelos 10 poldros de mama, com até dez dias de idade, 6 (60%) destes originaram resultados negativos e 4 (40%) resultados positivos para *T. equi*.

Analisando a distribuição dos animais no conjunto da amostragem utilizada para o estudo da prevalência de piroplasmose, verificamos que os animais positivos (48,94%), para ambos os agentes pesquisados, se encontram distribuídos da seguinte forma:

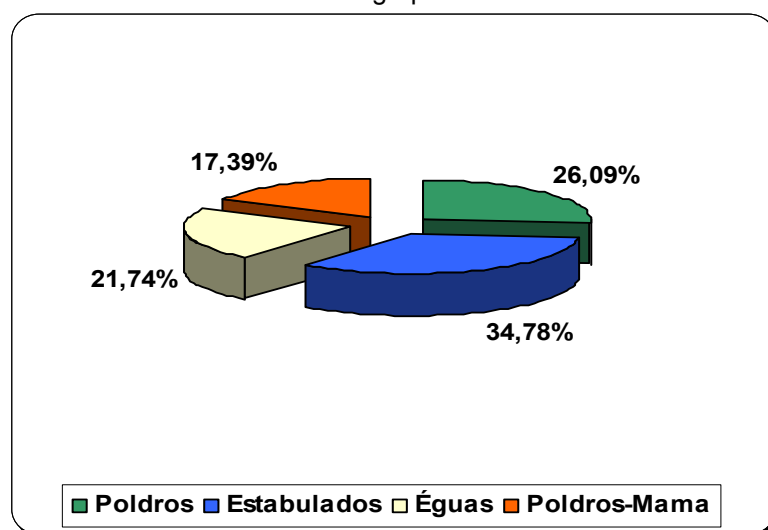
- 17,02% pertencem aos cavalos estabulados;
- 12,77% correspondem aos poldros e poldras com 8 a 9 meses de idade;
- 10,64% fazem parte do grupo composto pelas éguas de ventre;
- e 8,51% dizem respeito aos poldros de mama (gráfico 11).

Gráfico 11 – Representação gráfica da distribuição dos animais analisados nos seus diferentes grupos de estudo.



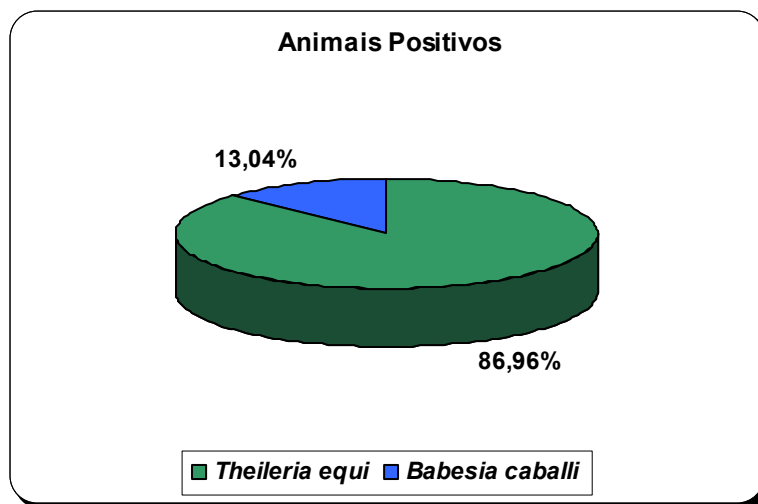
Assim sendo, ao analisarmos a distribuição os animais que resultaram positivos da análise dos esfregaços sanguíneos nos diferentes grupos estudados, concluímos que o grupo constituído pelos cavalos estabulados apresenta 34,78% do total das amostras positivas, seguido pelo grupo composto pelos poldros e poldras com oito a nove meses de idade, apresentando um valor de 26,09% do total dos animais positivos para os agentes da piroplasmose. As 11 éguas de ventre estudadas constituíram um grupo composto por 21,74% dos animais afectados pelos agentes pesquisados enquanto que o grupo composto pelos dez poldros de mama é o que apresenta a percentagem de infecção mais baixa (17,39%), quando comparado com os restantes grupos estudados (gráfico 12).

Gráfico 12 – Representação gráfica da distribuição dos animais positivos nos diferentes grupos analisados.



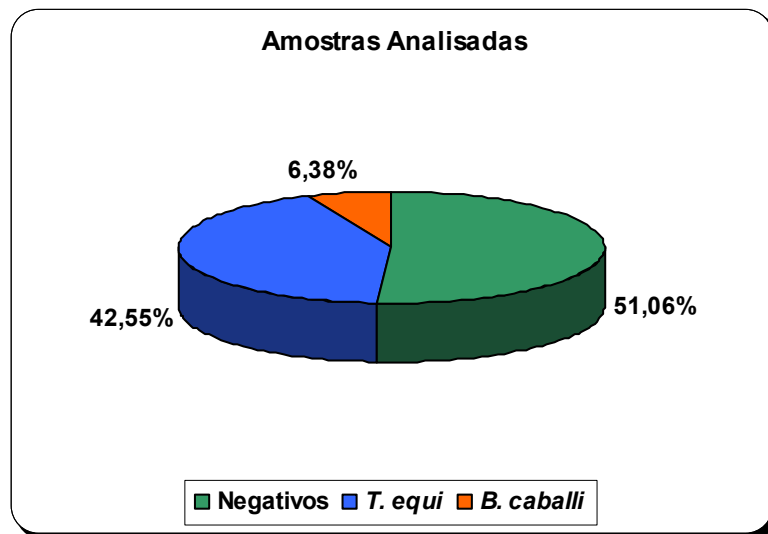
Ainda em relação a estes 23 animais, que deram resultado positivo para os agentes responsáveis pela piroplasmose equina, verificou-se que apenas 3 (13,04%) exibiram esfregaços positivos para *B. caballi*, sendo os restantes 20 (86,96%) positivos apenas para *T. equi* (gráfico 13).

Gráfico 13 – Representação gráfica da percentagem encontrada entre os animais positivos, para cada agente pesquisado.



Tendo em consideração a totalidade dos animais utilizados neste estudo, chega-se à conclusão de que 51,06% são considerados negativos para *T. equi* e *B. caballi*. Considerando a totalidade dos animais analisados neste estudo, apenas 6,38% deles apresentaram esfregaços positivos para o agente *B. caballi*, enquanto que os equinos com resultados positivos para *T. equi* perfizeram 42,55%, num total de 48,94% de amostras positivas analisadas (gráfico 14).

Gráfico 14 – Representação gráfica da percentagem de animais negativos e positivos, considerando cada um dos agentes pesquisados, na amostragem analisada.



5.3. OBSERVAÇÃO E EXAME CLÍNICO DE ANIMAIS NATURALMENTE INFECTADOS

No momento da colheita todos os animais se apresentavam saudáveis, a avaliar pelo exame de estado geral.

Contudo, mais tarde surgiram dois poldros, C1 e C9 (pertencentes ao grupo dos poldros com oito a nove meses de idade), que se apresentaram com sinais típicos de piroplasmose. O poldro C1 apresentava-se magro, com ligeira icterícia e sem febre, apresentando-se o seu esfregaço sanguíneo como positivo para *B. caballi*, o que levou ao diagnóstico provável de babesiose equina. A poldra C9 (figura 18) tinha sinais mais marcados, apresentando-se magra, com febre (40,5 °C), ligeira icterícia na mucosa ocular e pequeno grau de anemia na mucosa oral, tendo o seu esfregaço sanguíneo resultado positivo para *T. equi*. Para ambos os casos foi instituída a terapêutica específica para piroplasmose, com a administração de dipropionato de imidocarb (Imizol®), na dose de 2 ml/100 kg de peso, via IM para C1, e duas doses de 2 ml/100 kg de peso, via IM, com um intervalo de 72 horas entre elas, no caso de C9. Este tratamento permitiu a remissão dos sinais clínicos em ambos os animais, bem como uma melhoria da sua condição corporal.

Figura 18– Poldra C9 e respectivo esfregaço sanguíneo (Original).



A poldra apresentava-se magra e ligeiramente anémica e ictérica. O seu esfregaço sanguíneo (à direita), evidenciava a presença de *T. equi* no interior de um eritrócito (ponteiro).

Foi-nos relatado, também, o caso do equino C16 (figura 19), apresentar uma queda na sua condição corporal bem como uma baixa de rendimento. Ao exame físico não foram diagnosticadas quaisquer alterações nas frequências cardíaca e respiratória, apresentando apenas as mucosas oculares ligeiramente congestionadas.

Figura 19 – Equino C16 e esfregaço sanguíneo respectivo (Original).



Imagem do cavalo C16, que se apresentava apenas com ligeira diminuição da sua condição corporal. Esfregaço sanguíneo onde se observa a presença de *T. equi* no interior de um eritrócito (ampliação: 1000X).

Tendo a informação de que este animal apresentava resultado positivo para *T. equi* no esfregaço sanguíneo, resolvemos proceder ao seu tratamento com Imizol[®] administrando duas doses de 2 ml/100 kg de peso, com um intervalo de 72 horas entre ambas, por via IM. Verificou-se uma melhoria da condição corporal do animal, contudo a sua performance não pode ser avaliada, pois posteriormente a esta situação surgiu um episódio de claudicação, que impediu o animal de ser exercitado convenientemente, de modo a avaliar esse parâmetro.

6. DISCUSSÃO

Actualmente a piroplasmose equina reveste-se de uma importância económica crescente no mercado internacional de equinos, sendo reconhecido o seu impacto na produção de cavalos nacional, nomeadamente da raça Puro Sangue Lusitano. Para além da inviabilização de trocas comerciais entre criadores nacionais e potenciais compradores de países indemnes de piroplasmose, a doença traduz-se também em perdas económicas representadas pelo impedimento do transporte de equinos entre países, com a finalidade de participação em eventos equestres internacionais. No que diz respeito a importantes animais de competição, a evolução da doença, com o aparecimento de sintomatologia clínica, reveste-se de grande preocupação pelo facto de condicionar bastante o treino destes equinos, além de aumentar o custo de manutenção destes animais em condições favoráveis ao seu desempenho atlético.

Tendo em consideração estes factos, pareceu-nos importante desenvolver este trabalho, abordando a questão da pouco esclarecida transmissão transplacentária dos agentes da piroplasmose equina, e procedendo à avaliação da prevalência desta infecção no efectivo equino de uma das principais coudelarias de puro sangue Lusitano do nosso país, localizada na região do Ribatejo.

A possível transmissão transplacentária de piroplasmose equina, relatada por Phipps e Otter (2004), considera a possibilidade de manutenção dos piroplasmas, particularmente de *T. equi*, em situações de ausência do vector biológico, através da sua transmissão congénita. Esta possibilidade, para além da pouca literatura existente sobre esta matéria, impulsionou a ideia da realização deste ensaio, até à data inédito em Portugal, segundo conhecimento do autor.

Sabendo-se que, após a inoculação dos esporozoítos de *T. equi* pela carraça no hospedeiro vertebrado, os esquizontes apenas são reconhecidos em células linfocitárias doze a catorze dias após a fixação das carraças ao hospedeiro vertebrado (Ali *et al.*, 1996), optou-se pela colheita de sangue dos poldros nos seus primeiros dez dias de vida. Desta forma a exclui-se a possibilidade de transmissão dos parasitas através do contacto com carraças, com tempo para multiplicação e desenvolvimento de parasitémia. Esta colheita precoce evita, assim, o risco de infecção através do vector biológico, permitindo a correcta avaliação da ocorrência de transmissão transplacentária.

Neste trabalho recorremos à técnica de diagnóstico por esfregaço sanguíneo, para determinar a presença de ambos os agentes responsáveis pela piroplasmose, o que nos permitiu esclarecer que 4 (40%) dos poldros resultaram positivo para *T. equi*, e que 6 (60%) apresentaram resultado negativo tanto para *T. equi* como para *B. caballi*. Das 5 reprodutoras positivas encontradas, 80% (4) produziram os 4 poldros positivos para *T. equi* do ensaio (gráfico 2), o que demonstra uma elevada possibilidade da ocorrência de infecção na vida *in utero*. Esta possibilidade foi reforçada, após termos submetido os resultados que obtivemos

ao teste exacto de Fischer, que verificou uma relação estatística entre os poldros positivos para *T. equi* e as éguas também positivas no exame aos esfregaços sanguíneos.

Logicamente, testes que permitam a detecção do parasita, como é o caso do esfregaço sanguíneo, são fundamentais no auxílio ao diagnóstico desde que o resultado da sua análise seja positivo, visto que para resultados negativos não se pode confirmar com total segurança a ausência dos piroplasmas no hospedeiro. Isto deve-se sobretudo pelo facto de mesmo em casos clínicos agudos de *B. caballi* e *T. equi*, a parasitémia ser muito baixa, variando entre 0,1-10% e 1-20% respectivamente, o que pode dificultar a detecção dos parasitas, através de microscopia. Este condicionalismo do método utilizado neste trabalho, poderá, então, ter subvalorizado os resultados positivos encontrados e o valor dos animais infectados poderá ser superior ao relatado.

As conclusões que retirámos deste ensaio permitem-nos afirmar que epidemiologicamente, a transmissão transplacentária dos agentes da piroplasmose equina poderá ter grande importância no aparecimento de animais doentes ou mesmo de portadores assintomáticos da doença. Os resultados encontrados podem ter significância tanto para o diagnóstico diferencial de doença neonatal equina como para o movimento internacional de equinos.

No seguimento deste ensaio, realizado para avaliar a ocorrência de transmissão transplacentária de piroplasmose nas éguas e poldros da Coudelaria da CL, pareceu-nos relevante proceder a um levantamento da situação epidemiológica nesta coudelaria, de grande importância na produção de cavalos no contexto nacional, localizada na região do Ribatejo.

Dos 150 cavalos pertencentes ao efectivo equino da Coudelaria da CL, colhemos amostras de 47 equinos, que representam 31,33% da população que pretendíamos estudar, sendo todas elas analisadas através do exame de esfregaços sanguíneos, teste em que nos baseámos para realizar este ensaio.

Para ambos os agentes de piroplasmose, *T. equi* e *B. caballi*, observámos uma percentagem de infecção de 48,94% entre os 47 cavalos testados, com uma predominância clara de animais infectados por *T. equi*.

Nesta exploração, apenas 6,38% de entre os 47 equinos analisados, resultaram positivos para *B. caballi*, o que é ligeiramente inferior aos resultados de 15,6% encontrados por Serra *et al.* (1993) para a região do Ribatejo e Oeste, utilizando o teste de FC. No entanto, ao compararmos os resultados que obtivemos com os de Malta (2001), numa pequena região alentejana, os nossos valores são francamente inferiores, já que para *B. caballi* este observou uma prevalência de 65,6%, utilizando como método de diagnóstico o teste IFI.

Os nossos resultados, obtidos através da análise de esfregaços sanguíneos, para *T. equi*, mostram uma prevalência de 42,55% na nossa exploração de estudo, que se assemelham bastante aos 45,3% encontrados por Serra *et al.* (1993), para a mesma região onde realizámos o nosso levantamento epidemiológico, o Ribatejo. Contudo, ao comparar os

nossos resultados com os obtidos por Malta (2001), verifica-se que os resultados obtidos por este são bastantes superiores aos nossos (85,1%).

A diferença encontrada entre os nossos resultados e os obtidos tanto por Malta (2001), como por Serra *et al.* (1993), bem como as diferenças nos resultados entre ambos os estudos, leva-nos a admitir que esta variabilidade se poderá dever ao facto do ensaio levado a cabo por Malta (2001) se ter realizado numa região diferente (Alentejo) daquela em que realizámos o nosso ensaio. Como os resultados do estudo de Serra *et al.* (1993) para a região do Ribatejo, são bastante idênticos aos valores de prevalência que encontramos para a mesma região, o facto de Malta (2001) ter realizado o estudo numa região diferente pode ser justificativo destas diferenças. Contudo, não pode ser descartado o facto da técnica utilizada por nós apresentar algumas limitações, como já foi referido, em comparação com as técnicas de IFI e de FC, utilizadas pelos outros dois autores.

O acompanhamento dos animais ao longo da realização deste trabalho, revelou que a grande maioria dos equinos positivos (20 dos 23 animais positivos) podem não apresentar qualquer sintomatologia compatível com o quadro clínico de babesiose, como a literatura refere, verificando-se apenas a ocorrência dos casos de dois poldros e um cavalo estabulado positivos (3 em 23 animais positivos), com sintomatologia característica da doença, como foi já anteriormente descrito. O facto dos animais desde jovens, quando ainda protegidos pelos anticorpos maternos, terem contacto com as carraças infectadas, permite que estes contraíam infecções sem que se desenvolvam sinais clínicos da doença, tornando-se portadores assintomáticos da doença, em especial de *T. equi*.

Ao observarmos os resultados da prevalência dos agentes no universo do nosso estudo, reparamos que o grupo constituído pelos equinos estabulados é o que maior percentagem de animais positivos apresenta, representados por 66,67% dos animais deste grupo. Seguidamente, encontram-se as éguas com 45,55% dos animais deste conjunto a resultarem como positivos na análise dos esfregaços sanguíneos, enquanto que o grupo formado pelos seus poldros apresenta a percentagem de positivos mais baixa do estudo (40%). O conjunto constituído pelos poldros de oito a nove meses de idade apresenta 42,86% de positivos, e 57,14% de animais com resultado negativo.

Talvez o tipo de exploração que se pratica nesta exploração possa contribuir para estes valores encontrados, já que tanto os poldros até aos 3 anos como as éguas reprodutoras, vivem em pastoreio permanente, estando, por isso, em permanente contacto com os vectores transmissores dos piroplasmas.

No que concerne apenas aos resultados positivos para ambos os agentes da piroplasmose equina, estes encontram-se divididos de forma independente, pelos diferentes grupos de estudo, apresentando-se a relação entre eles sem significância estatística quando submetidos ao teste ANOVA não paramétrico, isto é, o teste de Kruskal-Wallis.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com a realização deste trabalho, podemos destacar as seguintes conclusões:

- Apesar da técnica empregada para o diagnóstico de piroplasmose equina, não seja a mais sensível, podendo resultar, sobretudo, em falsos negativos, podemos concluir que existe a possibilidade de transmissão transplacentária de *T. equi*. Não pudemos, contudo, comprovar a possibilidade de transmissão transplacentária de *B. caballi*. Esta evidência pode revestir-se de grande importância na prática da clínica de equinos, especialmente no que diz respeito a área da neonatologia.

- Embora admitindo que a nossa amostragem possa não reflectir exactamente a realidade epidemiológica na Coudelaria da CL, e região onde se encontra, os nossos resultados permitem concluir que estamos perante uma região com elevados níveis de prevalência dos agentes, sobretudo *T. equi*, entre os equinos. Estes resultados, numa região tão importante na produção de equinos em Portugal como é o Ribatejo, não poderão deixar de se reflectir na exportação de cavalos, bem como na participação portuguesa em eventos que permitiriam uma maior divulgação do cavalo puro sangue Lusitano no mercado externo.

8. BIBLIOGRAFIA

- Ali, S., Sugimoto, C., & Onuma, M. (1996). Equine Piroplasmosis. *Journal of Equine Science*, 7(4), 67-77.
- Allsopp, M.T.E.P., & Allsopp, B.A. (2006). Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species. *Annals New York Academy of Sciences*, 1081, 509-517.
- Allsopp, M.T.E.P., Lewis, B.D., & Penzhorn, B.L. (2007). Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. *Veterinary Parasitology*, 148(2), 130-136.
- American Veterinary Medical Association (2006). *Equine Piroplasmosis Background*. Acedido em Nov. 22, 2007, disponível em: http://www.avma.org/reference/backgrounders/equine_piroplasmosis_bgnd.asp
- Amory, H., & Pitel, P.H. (2007). Le syndrome piro-like: diagnostic différentiel du syndrome piro-like sur la base des symptômes & cas cliniques de cas de syndrome piro-like incluant les moyens de diagnostic [versão electrónica]. In *Proceedings of the Annual Meeting of the Association Vétérinaire Equine Française, Deauville, France, 18-20 October*, pp. 248-265. Acedido em Dez. 22, 2007 em: <http://www.ivis.org/proceedings/avef/2007/amory2.pdf>
- Banerjee, D.P., Singh, B., Gautam, O.P., & Sarup, S. (1977). Cell-mediated immune response in equine babesiosis. *Tropical Animal Health Production*, 9, 153-158.
- Butler, C.M., Nijhof, A.M., van der Kolk, J.H., de Haseth, O.B., Taoufik, A., Jongejan, F., & Houwers, D.J. (2008). Repeated high dose imidocarb dipropionate treatment did not eliminate *Babesia caballi* from naturally infected horses as determined by PCR-reverse line blot hybridization. *Veterinary Parasitology*, 151, 320-322.
- Botteon, P.T.L., Botteon, R.C.C.M., Reis, T.P., & Massard, C.L. (2005). Babesiose em cavalos atletas portadores. *Ciencia Rural*, 35(5), 1136-1140. Acedido em Dez. 12, 2007, disponível em: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/331/33135523.pdf>
- Campillo, M.C. (1999). Ixodidosis. In Campillo, M.C., Vasquez, F.A.R., Fernandez, A.R.M., Acedo, M.C.S., Rodriguez, S.H., Lopez-Cozar, I.N., Baños, P.D., Romero, H.Q., Varela, M.C., *Parasitología Veterinária*. (pp. 606) . Madrid: McGraw-Hill – Interamericana de España.
- Center for Food Security & Public Health, Iowa State University (2003). *Equine Piroplasmosis*. Acedido em Nov. 23, 2007, disponível em: https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/equine_piroplasmosis.pdf
- Costa, P.P. (2005). *Avaliação dos possíveis efeitos embriotóxicos da administração do dipropionato de imidocarb no período de organogênese de ratos*. Dissertação de Mestrado em Patologia Experimental e Comparada. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo.
- De Wall, D.T., & Heerden, J.V. (2004). Equine Piroplasmosis. In Coetzer, J.A.W., Tustin, R.C., *Infectious Diseases of Livestock*. (2nd ed.). (pp. 425-432). USA: Oxford University Press.

- Diana, A., Guglielmini, C., Candini, D., Pietra, M., & Cipone, M. (2006). Cardiac arrhythmias associated with piroplasmosis in the horse: A case report. *The Veterinary Journal*, 174, 193-195.
- Dias, J.A.T.S. (1994). *As carraças (Acarina-Ixodoidea) da Península Ibérica: Algumas considerações sobre a sua biogeografia e relacionamento com a ixodofauna afropleártica e afrotropical*. Instituto de Investigação Científica Tropical / Secretaria de Estado da Ciência e Tecnologia, Estudos, Ensaios e Documentos, vol.158.
- Guimarães, A.M., Lima, J.D., Ribeiro, M.F.B. (1998). Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. *Parasitology Research*, 84, 323-327.
- Habela, M. (1993). Babesiosis equina. *O Médico Veterinário*, 37, 31-38.
- Hailat, N.Q., Lafi, S.Q., Al-Darraj, A.M., & Al-Ani, F.K. (1997). Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan. *Veterinary Parasitology*, 69, 1-8.
- Hanafusa, Y., Cho, K., Kanemaru, T., Wada, R., Sugimoto, C., & Onuma, M. (1998). Pathogenesis of *Babesia caballi* infection in experimental horses. *The Journal of Veterinary Medical Sciences*, 60(10);1127-1132. Acedido em Fev. 20, 2008, disponível em: http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/60/10/1127/_pdf
- Hinchcliff, K.W., Kaneps, A.J., & Geor, R.J. (2004). *Equine Sports Medicine and Surgery*. Saunders Ltd.
- Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S.R., Krause, P.J., & Persing, D.H. (2000). Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(3), 451-469.
- Irby, J.R. (2002). Anthrax, screwworms, and equine piroplasmosis – subdued but not eradicated. In *Proceedings of the 48th American Association of Equine Practitioners Annual Convention, Orlando, Florida, USA, 4-8 December*, pp. 12-15.
- Kerber, C.E., Ferreira, F., & Pereira, M.C. (1999). Control of equine piroplasmosis in Brazil. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 66, 123-127.
- Knowles, D.P., Kappmeyer, L.S., & Perryman, L.E. (1994). Specific immune responses are required to control parasitemia in *Babesia equi* infection. *Infection and Immunity*. 62(5), 1909-1913.
- Laveran, A. (1901). Contribution à l'étude du *Piroplasma equi*. *Comptes rendus des séances. Société de Biologie et de ses Filiales*, 53, 385-388.
- Madeira de Carvalho, L.M. (2001). *Epidemiologia e controlo da estrongilidose em diferentes sistemas de produção equina em Portugal*. Tese de Dissertação de Doutoramento. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.
- Mahoney, D.F., Wright, I.G., Frerichs, W.M., Groenendyk, S., O'Sullivan, B.M., Roberts, M.C., & Waddell, A.H. (1977). The identification of *Babesia equi* in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 53, 461-464.
- Malta, M.J.P.V. (2001). *Diagnóstico de Babesiose e Theileriose Equinas no Alentejo*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia Tropicais. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.

- Martin, R. (1999). Equine piroplasmosis: the temporary importation of seropositive horses into Australia. *Australian Veterinary Journal*, 77(5), 308-309.
- Melhorn, H., Schein, E. (1998). Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Melhorn, Schein 1998. *Parasitology Research*, 84, 467-475.
- Metcalf, E.S. (2001). The US importation and exportation of equine cryopreserved semen - the role of the veterinarian in practice. In *Proceedings of the 47th American Association of Equine Practitioners Annual Convention, San Diego, California, USA, November 24-28*, pp. 306-313.
- Mujica, F.F., Massard, C.L., Franque, M.P., Coronado, A., Forlano, M., & Suarez, C. (2004). Grado de infección y mortalidad en la garrapata del caballo *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae) naturalmente infectada por el protozoa *Babesia caballi* (Apicomplexa: Babesiidae). *Revista Científica, FCV-LUZ*, 14(5);440-443. Acedido em Feb. 8, 2008, disponível em: www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S079822592004010000009&lng=es&nrm=iso
- Navarrete, I., & Serrano F.J. (1999). Babesiosis. In Campillo, M.C., Vasquez, F.A.R., Fernandez, A.R.M., Acedo, M.C.S., Rodriguez, S.H., Lopez-Cozar, I.N., Baños, P.D., Romero, H.Q., Varela, M.C., *Parasitología Veterinaria*. (pp. 587-592). Madrid: McGraw-Hill – Interamericana de España.
- Nogueira, C.E.W., Silva, S.S., Nizoli, L.Q., Ribas, L.M., & Albuquerque, L.P.A.N. (2005). Efeito quimioprolático do dipropionato de imidocarb na prevenção da agudização de babesiose equina em cavalos portadores da infecção. *A Hora Veterinária*, 146;14-17. Acedido em Nov. 17, 2007, disponível em: <http://www.ufpel.edu.br/hcv/arquivos/paperimidocardschering5.pdf>
- Nuttall, G.H.F., Strickland, C. (1910). Die parasiten der Pferdepiroplasmose des biliary fever. *Centralblatt für Bakteriologie. Parasitenkunde und Infektionskrankheiten Abteilung*, 56, 524-525.
- Office International des Épizooties (2004). *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)* (5th ed.). Paris: OIE.
- Pereira, M.A.V.C., Massard, C.L., Faccini, J.L.H., & Siqueira, L.F.G. (2004). Ocorrência de *Babesia equi* (Laveran, 1901) e *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1912) em equinos da raça puro sangue inglês de pequenos estabelecimentos equestres. *Arquivos do Instituto Biológico*, 71(4);405-409. Acedido em Jan. 7, 2008, disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V71_4/pereira.PDF
- Phipps, L.P., Otter, A. (2004). Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. *The Veterinary Record*, 154, 406-408.
- Plumb, D.C. (2005). *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. (5th ed.). Iowa: Blackwell Publishing.
- Portz, C., Almeida, F.Q., Massard, C.L., & Botteon, P.F.L. (2007). Avaliação da vitamina E como imunomodulador e infecção intrauterina por *Theileria equi* em potro. *Parasitologia Latinoamericana*. 62, 16-22.
- Radostits, O.M., Gay C.C., Hinchcliff, K.W., & Constable P.D. (Eds.). (2007). *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. (10th ed.). Saunders Elsevier.

- Roncati, N.V. (2006). *Ocorrência de Theileria equi em potros Puro Sangue Lusitano no Brasil, diagnosticada através da técnica de RT-PCR*. Tese de Doutorado em Clínica Veterinária. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo.
- Rüegg, S., Walzer, C., Robert, N., Doherr, M., & Friedhoff, K.T. (2002). Disease risk assessment: Piroplasmosis at the reintroduction site of the Przewalski horse (*Equus przewalskii*) in the Dsungarian Gobi, Mongolia [versão electrónica]. In A. Erken (Ed.), *4th Scientific Meeting of the European Association of Zoo- and Wildlife Veterinarians and 5th Meeting of the European Wildlife Disease Association, Heidelberg, Germany, 8-12 May*. Acedido em Nov. 27, 2007 em: <http://www.ivis.org/proceedings/eazwv/2002/Conservation/conservation.pdf>
- Sandersen, C., Pitel, P.H., & Amory, H. (2007). Diagnostic differential du syndrome “piro-like” chez les équides [versão electrónica]. In *Proceedings of the Annual Meeting of the Belgian Equine Practitioners Society, Leuven, Belgium, 10th November*, pp. 97-108. Acedido em Dez. 12, 2007 em: http://www.ivis.org/proceedings/beps/2007/sandersen_fr.pdf?LA=3
- Serra, J.M.S., Fonseca, I.M.P., Carvalho, L.M.M., & Varela, M.C. (1993). Estudo das parasitoses dos equídeos do Ribatejo: II Babesioses. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 1.
- Sloss, M.W., Kemp, R.L., & Zajac, A.M. (1999). *Parasitologia Clínica Veterinária*. Editora Manole Ltd.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W. (1996). *Veterinary Parasitology*. (2nd ed.). Scotland: Blackwell Science Ltd.
- Vial, H.J., Gorenflot, A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 138, 147-160.
- Zaugg, J.L. (2002). Babesiosis. In Smith, B.P., *Large Animal Internal Medicine*. (pp. 1051-1055). St. Louis, Missouri, USA: Mosby Inc.
- Zweygarth, E., Ahmed, J.S., & Rehbein, G. (1983). Cell-mediated immune response to *Babesia equi* transformed lymphoblastoid cells *un vitro*. *Centralblatt für Bakteriologie. Parasitenkunde und Infektionskrankheiten Abteilung*, 254, 281-289.

ANEXO 1 – Resultado da análise dos esfregaços sanguíneos, tanto para *T. equi* como para *B. caballi*, nos diferentes grupos de animais estudados.

Nº ANIMAIS	IDENTIFICAÇÃO ANIMAL	RESULTADO	GRUPOS
1	C1	<i>B. caballi</i>	POLDROS
2	C2	Negativo	
3	C3	Negativo	
4	C4	<i>B. caballi</i>	
5	C5	Negativo	
6	C6	Negativo	
7	C7	Negativo	
8	C8	<i>B. caballi</i>	
9	C9	<i>T. equi</i>	
10	C10	Negativo	
11	C11	Negativo	
12	C12	<i>T. equi</i>	
13	C13	<i>T. equi</i>	
14	C14	Negativo	ESTABULADOS
15	C15	Negativo	
16	C16	<i>T. equi</i>	
17	C17	<i>T. equi</i>	
18	C18	<i>T. equi</i>	
19	C19	<i>T. equi</i>	
20	C20	Negativo	
21	C21	Negativo	
22	C22	<i>T. equi</i>	
23	C23	<i>T. equi</i>	
24	C24	Negativo	ÉGUAS E POLDROS DE MAMA
25	C25	<i>T. equi</i>	
26	C26	<i>T. equi</i>	
27	E1	<i>T. equi</i>	
28	P1	<i>T. equi</i>	
29	E2	<i>T. equi</i>	
30	P2	<i>T. equi</i>	
31	E3	<i>T. equi</i>	
32	P3	<i>T. equi</i>	
33	E4	Negativo	
34	P4	Negativo	
35	E5	Negativo	
36	P5	Negativo	
37	E6	<i>T. equi</i>	
38	P6	Negativo	
39	E7	Negativo	
40	P7	Negativo	
41	E8	Negativo	
42	P8	Negativo	
43	E9	<i>T. equi</i>	
44	P9	<i>T. equi</i>	
45	E10	Negativo	
46	P10	Negativo	
47	E11	Negativo	